(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5773872号
(P5773872)

(45)発行日　平成27年9月2日(2015.9.2)　(24)登録日　平成27年7月10日(2015.7.10)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| C12Q 1/02 | (2006.01) | C12Q | 1/02 | ZNA |
| C07K 14/51 | (2006.01) | C07K | 14/51 | |
| A61K 8/64 | (2006.01) | A61K | 8/64 | |
| A61K 38/00 | (2006.01) | A61K | 37/02 | |
| A61K 45/00 | (2006.01) | A61K | 45/00 | |

請求項の数 9　(全 27 頁)　最終頁に続く

| | |
|---|---|
| (21)出願番号 | 特願2011-525630 (P2011-525630) |
| (86)(22)出願日 | 平成21年9月8日(2009.9.8) |
| (65)公表番号 | 特表2012-501639 (P2012-501639A) |
| (43)公表日 | 平成24年1月26日(2012.1.26) |
| (86)国際出願番号 | PCT/GB2009/051139 |
| (87)国際公開番号 | WO2010/029343 |
| (87)国際公開日 | 平成22年3月18日(2010.3.18) |
| 審査請求日 | 平成24年3月29日(2012.3.29) |
| (31)優先権主張番号 | 0816507.8 |
| (32)優先日 | 平成20年9月10日(2008.9.10) |
| (33)優先権主張国 | 英国(GB) |
| (31)優先権主張番号 | 0908498.9 |
| (32)優先日 | 平成21年5月18日(2009.5.18) |
| (33)優先権主張国 | 英国(GB) |

(73)特許権者　511060076
ユニバーシティー　オブ　ブラッドフォード
ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ　ＯＦ　ＢＲＡＤＦＯＲＤ
イギリス国　ヨークシャー　ビーディー７　１ディーピー　ウェスト　ヨークシャー　ブラッドフォード　リッチモンド　ロード
(74)代理人　100147485
弁理士　杉村　憲司
(74)代理人　100119530
弁理士　冨田　和幸
(74)代理人　100144266
弁理士　鈴木　一寿

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

対象個体の皮膚及び／又は毛髪のメラニン色素沈着を増加させるための、ＢＭＰ６又はその断片若しくは変異体を含む組成物であって、

該変異体が、ＢＭＰ６と少なくとも７０％の配列同一性を有し、

該断片又は該変異体が、メラニン形成又はメラニン転移を調節する能力を示し、且つ配列番号１によってコードされるか又は配列番号１のアミノ酸３７４～５１３若しくは配列番号１のアミノ酸３８２～５１３若しくは配列番号１のアミノ酸３８８～５１３若しくは配列番号１のアミノ酸４１２～５１３を含む、組成物。

【請求項２】

前記ＢＭＰ６又はその断片若しくは変異体が、ＡＬＫ６の活性を調節することによってＣｄｃ４２の発現を調節する、ＢＭＰ６若しくはその断片又はそれらの変異体を含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

対象個体の皮膚及び／又は毛髪のメラニン色素沈着を低減するための、ＢＭＰ６拮抗薬であるスクレロスチンを含む組成物。

【請求項４】

皮膚及び／又は毛髪の色素沈着減少の治療に用いられる、ＢＭＰ６又はその断片若しくは変異体を含む組成物であって、

該変異体が、ＢＭＰ６と少なくとも７０％の配列同一性を有し、

該断片又は該変異体が、メラニン形成又はメラニン転移を調節する能力を示し、且つ配列番号１によってコードされるか又は配列番号１のアミノ酸３７４～５１３若しくは配列番号１のアミノ酸３８２～５１３若しくは配列番号１のアミノ酸３８８～５１３若しくは配列番号１のアミノ酸４１２～５１３を含む、組成物。

【請求項５】

白斑の治療に用いられる、ＢＭＰ６又はその断片若しくは変異体を含む、請求項４に記載の組成物。

【請求項６】

皮膚及び／又は毛髪の色素沈着過度の治療に用いられる、スクレロスチンを含む、組成物。

【請求項７】

炎症後色素沈着過度、メラズマ、クロズマ、老年性黒子、日光黒子、又はそばかすの治療に用いられる、スクレロスチンを含む組成物。

【請求項８】

皮膚及び／又は毛髪のメラニン色素沈着のレベルを調節することによって皮膚及び／又は毛髪の色を暗くするための化粧品組成物であって、

ＢＭＰ６又はその断片若しくは変異体を含み、ＢＭＰ６又はその断片若しくは変異体を含み、該変異体がＢＭＰ６と少なくとも７０％の配列同一性を有し、該断片又は該変異体がメラニン形成又はメラニン転移を調節する能力を示し、且つ配列番号１によってコードされるか又は配列番号１のアミノ酸３７４～５１３若しくは配列番号１のアミノ酸３８２～５１３若しくは配列番号１のアミノ酸３８８～５１３若しくは配列番号１のアミノ酸４１２～５１３を含む、化粧品組成物。

【請求項９】

皮膚及び／又は毛髪のメラニン色素沈着のレベルを調節することによって皮膚及び／又は毛髪の色を明るくするための化粧品組成物であって、

ＢＭＰ６拮抗薬であるスクレロスチンを含む、化粧品組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、皮膚におけるメラニン色素沈着を研究および調節するのに有用な組成物および方法に関する。本発明は、これらに限定しないが、特に、メラニン細胞からケラチン細胞への、潜在的にはケラチン細胞からケラチン細胞へのメラニンの転移を調節することができる組成物、こうした組成物を同定するための分析、および皮膚色素沈着の調節方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

メラニン細胞は、表皮および毛球の基底層に沿って分布する神経堤誘導細胞である。これらの細胞は、メラノソームと呼ばれるメラニン細胞特異的細胞小器官内でメラニン色素を合成する。皮膚および毛髪に色素沈着させるためには、このメラニンをメラニン細胞から隣接するケラチン細胞へ転移させなければならない。哺乳類の皮膚および毛髪／羊毛／毛皮の色は、一連の異なる分子および化合物により複数の管理点で規定される多数の工程を含むプロセスにおけるメラニンの量および質（褐／黒ユーメラニンまたは赤／黄フェオメラニン）によって決まる。ここ数十年、メラニン合成およびメラノソーム生物発生／成熟の分子的調節についての我々の理解にはかなりの進歩が見られた。しかしながら、我々の知識には、このプロセスが最終的に皮膚表面でおよび毛髪繊維に沿って認められる色素沈着のレベルを調節するため主要な臨床的／美容的関心である、メラニン転移がどのように調節されるかということを中心とする大きなギャップがある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００３】
本出願では、ヒト皮膚メラニン細胞からヒト皮膚ケラチン細胞へのメラニン転移を調節する新規機序について記載する。この機序は、このプロセスを用量依存的に刺激するＢＭＰ６の作用を含む。
【０００４】
骨形成タンパク質（ＢＭＰ）は、分泌されたシグナル伝達分子であり、ＴＧＦ－βスーパーファミリーに属する。それらは、細胞増殖、分化、運動、接着、および細胞死において重要な役割を果たす（Ｈｏｇａｎ，１９９６）。これまで２０を超える異なるＢＭＰファミリーメンバーについて説明されており、それぞれ特定のＢＭＰ受容体との相互作用によってその生物活性を発揮する（Ｗｏｚｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８）。ＢＭＰシグナル伝達は、ＢＭＰタイプ、拮抗薬の存在、標的組織の成長段階、および標的細胞受容体タイプに応じて複数のレベルで行われる（Ｂｏｔｃｈｋａｒｅｖ，２００３）。ＢＭＰは、２つの膜貫通受容体ファミリー、複合ＢＭＰ受容体（ＢＭＰＲ）Ｉおよび単一ＢＭＰＲＩＩを結合する（Ｈｏｇａｎ，１９９６）。興味深いことに、シグナル伝達を開始するには、ＢＭＰは両受容体を結合し、ＢＭＰ－ＲＩＩによるＢＭＰＲＩにおける細胞内ドメインのリン酸化反応を誘導し、細胞内シグナル変換を活性化しなければならない。
【０００５】
ＢＭＰは皮膚成長の強力な調節因子であり、正常な出生後の皮膚における表皮恒常性、毛包成長、およびメラニン形成の調節にも重要な役割を果たす（Ｂｏｔｃｈｋａｒｅｖ，２００３）。メラニン細胞は、胚形成中に表皮および毛包へ転移し、その後ケラチン細胞の周りにメラニンを合成および分布する神経堤誘導細胞である（Ｈａｌａｂａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。興味深いことに、いくつかのＢＭＰＲＩ受容体、ＢＭＰＲＩＡ（ＡＬＫ３；Ｓｅｑ　ＩＤ　４）、ＢＭＰＲＩＢ（ＡＬＫ６；Ｓｅｑ　ＩＤ　２）、およびＡｃｔＲ－Ｉ（ＡＬＫ２）があり（Ｋａｗａｂｔａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）、神経前駆細胞では、ＡＬＫ３によるシグナル伝達はそれらの増殖を誘導するが、ＡＬＫ６はそれらの分化を誘導し（Ｐａｎｃｈｉｓｉｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）、受容体発現が細胞へのＢＭＰ作用を決めることを示す。
【０００６】
メラニン細胞生物学におけるＢＭＰ４の役割は、Ｇｉｌｃｈｒｅｓｔグループにより、この特定のＢＭＰファミリーメンバーが、メラニン細胞における律速酵素（チロシナーゼ）の発現および活性を阻害することにより正常なヒトメラニン細胞におけるメラニン形成のオートクリン阻害因子として作用することを示す研究において初めて示された（Ｙａａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）。
【０００７】
しかしながら、メラニン細胞生物学（例えば、メラニン形成および／またはメラニン転移）への他のＢＭＰタンパク質の関与はこれまで報告されていない。メラニン細胞におけるメラニン形成（すなわちメラニン合成）の調節についてはかなり知られているが、メラノソームがメラニン細胞からケラチン細胞へどう転移するかについての我々の知識はまだ非常に限られている。細胞食作用の役割に加えて、ケラチン細胞のプラズマ膜と相互作用することができる糸状仮足によるメラノソーム転移を裏付ける証拠が増えている（Ｓｃｏｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００２、Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）。重要なことには、メラニン細胞の樹状突起の側面および先端から生じる糸状仮足と適合し、内腔にメラノソームを含有する構造は、ヒト皮膚ｉｎ　ｓｉｔｕおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてすでに報告されている（Ｓｃｏｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００２）。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
本発明の第１態様によれば、対象の皮膚および／または毛髪のメラニン色素沈着の調節方法であって、対象にＡＬＫ６（ＳＥＱ　ＩＤ　２）またはＣｄｃ４２の活性または発現を調節することができる物質を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。
【０００９】

本発明の好適な実施形態では、その物質はＡＬＫ６の活性を調節することによってＣｄｃ４２の発現を調節する。

【００１０】

本発明の好適な実施形態では、その方法は対象の皮膚および／または毛髪の外表面への組成物の塗布を含む。

【００１１】

皮膚の色素沈着を調節するためには、主に２つのアプローチ：メラニン形成の調節およびメラニン転移の調節がある。本発明は、これらのアプローチの一方、他方または両方を含むことができる。しかしながら、本発明者らがメラニン転移を効果的に標的とすることができることを見出したので、メラニン転移を調節する方法はとくに興味深い。メラニン形成よりさらに「下流」のプロセスであることを考えると、悪影響を回避するという点でより魅力的な標的である。

【００１２】

適切には、その方法は、皮膚および／または毛髪のメラニン色素沈着のレベルを調節することにより皮膚および／または毛髪の色を美容のために明るくするまたは暗くするのに有用な美容方法である。

【００１３】

あるいは、その方法は、対象に一定の光防護を提供するのに用いることができる。メラニンが紫外線の損傷作用の多くから皮膚を保護することは周知である。従って、対象の皮膚におけるメラニンの量を増加させることは、日光誘発性損傷、例えば癌または早期老化を引き起こす可能性のある細胞の変異を低減するのに重要であり得る。

【００１４】

別の代替方法では、その方法は、皮膚の異常な色素沈着に関連する病状を治療するのに用いることができる。こうした治療は治癒的であってもよく、症状を軽減するために用いられてもよい。治療することができる皮膚の異常な色素沈着に関連する疾病または病状としては、色素沈着過度（例えば、メラズマ（肝斑）、クロアズマ（肝斑）、老年性黒子、日光黒子、そばかす、炎症後色素沈着過度）および色素沈着減少（例えば、白斑、炎症後色素沈着減少）ならびに皮膚損傷の結果としての色素沈着喪失が挙げられる。

【００１５】

１つの実施形態では、その物質は正常な生理的レベルに対してＡＬＫ６の活性または発現を増加させることができる、すなわちＡＬＫ６作用薬である。特定の実施形態では、その物質は、メラニン転移を増加させるようにＡＬＫ６の活性または発現を増加させることができる。ＡＬＫ６活性の増加は皮膚および／または毛髪におけるメラニンの増加をもたらす。

【００１６】

別の実施形態では、その物質は正常な生理的レベルに対してＡＬＫ６の活性または発現を減少させることができる、すなわちＡＬＫ６拮抗薬である。特定の実施形態では、その物質は、メラニン転移を減少させるようにＡＬＫ６の活性または発現を減少させることができる。ＡＬＫ６活性の減少は皮膚および／または毛髪におけるメラニンの減少をもたらす。

【００１７】

１つの実施形態では、本発明の方法は、ＢＭＰ６ポリペプチド（受入番号ＮＭ＿００１７１８；Ｓｅｑ　ＩＤ　１）またはその断片もしくは変異体を含む組成物の塗布を含むが、該断片または変異体は機能的に活性である。

【００１８】

断片または変異体は、ＡＬＫ６を野生型ＢＭＰ６と同じくらい効率的に少なくとも５０％活性化することができる場合に機能的に活性であるということができるが、低活性レベルもまた有用であり得る。より好適には、こうした断片または変異体は、野生型ＢＭＰ６の少なくとも７５％活性、とくに野生型ＢＭＰ６の９０％活性でなければならない。とく

に、この文脈において「活性」とは、後述の分析におけるメラニン細胞からケラチン細胞へのメラニンの転移を刺激する能力を意味することができる。

【００１９】

「機能的に活性な」ＢＭＰ６断片または変異体は、後述の分析を用いて決定されるように、メラニン形成またはメラニン転移を増加させる能力を示す。ＢＭＰ６タンパク質、変異体および断片の機能的活性は、当業者に知られ（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９８）Ｃｏｌｉｇａｎ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｍｅｒｓｅｔ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ）、さらに後述するような各種方法により決定することができる。

【００２０】

ここでの目的のため、機能的に活性な断片としては、ドメインが所望の活性を有する場合、結合ドメインのようなＢＭＰ６の構造ドメインを１つ以上含む断片を挙げることができる。タンパク質ドメインはＰＦＡＭプログラムを用いて同定することができる（Ｂａｔｅｒｍａｎ　Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ，１９９９，２７：２６０－２）。いくつかの実施形態では、好適な断片は、ＢＭＰ６活性ドメインの少なくとも２５個の連続したアミノ酸、好適には少なくとも５０個、より好適には７５個、もっとも好適には少なくとも１００個の連続したアミノ酸を含む、機能的に活性な、ドメイン含有断片である。さらに好適な実施形態では、断片は機能的に活性なドメイン全体を含む。

【００２１】

機能的に活性な断片または変異体は、ＢＭＰ６コード化核酸によりコード化されるものを含む、組み換え型ＢＭＰ６ポリペプチドおよびこれらの機能的に活性な断片または変異体を含む。

【００２２】

機能的に活性なＢＭＰ６ポリペプチドは、理論的にはＢＭＰ６前駆体タンパク質（受入番号Ｐ２２００４）（ＳＥＱ　ＩＤ　１）を含むことができる。成熟ＢＭＰ６ポリペプチドはそのアミノ酸３７４～５１３個を含むと考えられる。

【００２３】

機能的に活性な断片は、ＢＭＰ６前駆体（ＳＥＱ　ＩＤ　１）のアミノ酸３８２～５１３、３８８～５１３および４１２～５１３を含むポリペプチドを含むことができる。

【００２４】

「ＢＭＰ６コード化核酸」の語は、ＢＭＰ６ポリペプチドをコード化するＤＮＡまたはＲＮＡ分子を指す。

【００２５】

好適には、ＢＭＰ６ポリペプチドもしくは核酸またはこれらの変異体もしくは断片はヒト由来であるが、これらの同族体または誘導体とすることもできる。

【００２６】

好適には、これらの前記変異体または断片は、ヒトＢＭＰ６またはＢＭＰ６をコード化する配列（ＮＭ００１７１８）と少なくとも７０％の配列同一性、好適には少なくとも８０％、より好適には８５％、さらにより好適には９０％、もっとも好適には少なくとも９５％の配列同一性を有する。

【００２７】

本明細書で用いる対象配列、または対象配列の特定部分に対する「配列同一性パーセント（％）」は、プログラムＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２．０ａ１９（Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９７）２１５：４０３－４１０）によりすべて初期値に設定した検索パラメーターを用いて生成される最大配列同一性パーセントを達成するため必要に応じて配列および導入ギャップを整列した後の、対象配列（またはその特定部分）におけるヌクレオチドまたはアミノ酸と同一の候補誘導配列におけるヌクレオチドまたはアミノ酸の割合と定義される。ＨＳＰ　ＳおよびＨＳＰ　Ｓ２パラメーターは動的値であり、特定の配列の組成物および特定のデータベースの組成物に応じてプログラムそ

のものにより設定され、これに対して興味のある配列が検索されている。同一性％の値は、配列長さで割った一致する同一のヌクレオチドまたはアミノ酸の数により割り出され、これにより同一性パーセントが報告されている。「アミノ酸配列類似性パーセント（％）」は、アミノ酸配列同一性％を割り出すのと同じ計算を行うことにより割り出されるが、計算は同一アミノ酸に加えて保存アミノ酸置換を含む。

【００２８】

保存アミノ酸置換は、アミノ酸をタンパク質の折り畳みまたは活性に大きな影響を及ぼさないように類似特性を有する別のアミノ酸と置き換えるものである。互いに置き換えることができる芳香族アミノ酸としてはフェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンがあり；置き換え可能な疎水性アミノ酸としてはロイシン、イソロイシン、メチオニン、およびバリンがあり；置き換え可能な極性アミノ酸としてはグルタミンおよびアスパラギンがあり；置き換え可能な塩基性アミノ酸としてはアルギニン、リシンおよびヒスチジンがあり；置き換え可能な酸性アミノ酸としてはアスパラギン酸およびグルタミン酸があり；置き換え可能な小アミノ酸としてはアラニン、セリン、トレオニン、システインおよびグリシンがある。

【００２９】

あるいは、核酸配列は、ＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎの局所相同性アルゴリズム（Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，１９８１，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃｓ ２：４８２－４８９；ｄａｔａｂａｓｅ：Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ；Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，１９８１，Ｊ．ｏｆ Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．，１４７：１９５－１９７；Ｎｉｃｈｏｌａｓ ｅｔ ａｌ．，１９９８，“Ａ Ｔｕｔｏｒｉａｌ ｏｎ Ｓｅａｒｃｈｉｎｇ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａｂａｓｅｓ ａｎｄ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｓｃｏｒｉｎｇ Ｍｅｔｈｏｄｓ”（ｗｗｗ．ｐｓｃ．ｅｄｕ）およびその引用文献；Ｗ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ，１９９１，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ １１：６３５－６５０）により整列される。このアルゴリズムは、Ｄａｙｈｏｆｆ（Ｄａｙｈｏｆｆ：Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｍ．Ｏ．Ｄａｙｈｏｆｆ ｅｄ．，５ ｓｕｐｐｌ．３：３５３－３５８，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．，ＵＳＡ）により開発され、Ｇｒｉｂｓｋｏｖ（Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，１９８６，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１４（６）：６７４５－６７６３）により標準化された得点マトリックスを用いることによりアミノ酸配列に適用することができる。Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムは、得点に初期パラメーター（例えば、ギャップ開放ペナルティは１２、ギャップ伸張ペナルティは２）を用いる場合に用いることができる。生成されたデータから、「一致」値は「配列同一性」を反映する。

【００３０】

対象核酸分子の誘導核酸分子は、ＢＭＰ６をコード化する核酸配列にハイブリダイズする配列を含む。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーションおよび洗浄中の温度、イオン強度、ｐＨ、およびホルムアミドのような変性剤の存在により調節することができる。通常用いられる条件は、容易に入手可能な手順書（例えばＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｃｈａｐ．２．１０，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ（１９９４）；Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ（１９８９））に記載されている。

【００３１】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸分子は高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下でＢＭＰ６のヌクレオチド配列を含有する核酸分子へハイブリダイズすることができるが、その条件とは：６倍単一強度クエン酸塩（ＳＳＣ）（１倍ＳＳＣは０．１５ＭのＮａＣｌ、０．０１５Ｍのクエン酸Ｎａ；ｐＨ７．０）、５倍デンハルト溶液、０．０５％ピロリン酸ナトリウムおよび１００ｇ／ｍのニシン精子ＤＮＡを含む溶液中での

６５℃で８時間から一晩の、核酸を含有するフィルターのプレハイブリダイゼーション；６倍ＳＳＣ、１倍デンハルト溶液、１００μｇ／ｍｌの酵母ｔＲＮＡおよび０．０５％ピロリン酸ナトリウムを含有する溶液中での６５℃で１８～２０時間のハイブリダイゼーション；ならびに０．１倍ＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）を含有する溶液中での６５℃で１時間のフィルターの洗浄である。

【００３２】

他の実施形態では、中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件が用いられるが、その条件とは：３５％ホルムアルデヒド、５倍ＳＳＣ、５０ｍＭのトリス－ＨＣＬ（ｐＨ７．５）、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．１％ＰＶＰ、０．１％フィコール、１％ＢＳＡ、および５００μｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡを含有する溶液中での４０℃で６時間の核酸を含有するフィルターの前処理；３５％ホルムアルデヒド、５倍ＳＳＣ、５０ｍＭのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．０２％ＰＶＰ、０．０２％フィコール、０．２％ＢＳＡ、１００μｇ／ｍｌのサケ精子ＤＮＡ、および１０（重量／体積）％硫酸デキストランを含有する溶液中での４０℃で１８～２０時間のハイブリダイゼーション；その後の２倍ＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳを含有する溶液中での５５℃で１時間の２回の洗浄である。

【００３３】

あるいは、低ストリンジェンシー条件を用いることができるが、その条件とは：２０％ホルムアルデヒド、５倍ＳＳＣ、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５倍デンハルト溶液、１０％硫酸デキストラン、および２０μｇ／ｍｌの変性せん断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中での３７℃で８時間から一晩のインキュベーション；同じ緩衝液中での１８～２０時間のハイブリダイゼーション；ならびに１倍ＳＳＣ中での約３７℃で１時間のフィルターの洗浄である。

【００３４】

別の実施形態では、その方法は、ＢＭＰ６に結合し、不活性化することができる化合物を含む組成物の塗布を含む。従って、本発明はＢＭＰ６の拮抗薬に関するものであり得る。例えば、化合物は、ＢＭＰ６に結合することができる抗体またはその断片であってもよい。

【００３５】

とくにＢＭＰ６ポリペプチドを結合する抗体は、既知の方法を用いて生成することができる。好適には、その抗体はＢＭＰ６ポリペプチドの哺乳類オルソログ、より好適にはヒトＢＭＰ６に特有である。抗体は、ポリクロナール、モノクロナール（ｍＡｂ）、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖抗体、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、ＦＡｂ発現ライブラリーにより生成される断片、抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体、および上記のいずれかのエピトープ結合断片であってもよい。例えば、ＢＭＰ６ポリペプチドの抗原性の通常のスクリーニングにより、またはタンパク質の抗原性領域を選択する理論的方法（Ｈｏｐｐ ａｎｄ Ｗｏｏｄ（１９８１），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７８：３８２４－２８；Ｈｏｐｐ ａｎｄ Ｗｏｏｄ，（１９８３）Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０：４８３－８９；Ｓｕｔｃｌｉｆｆｅ ｅｔ ａｌ．，（１９８３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２１９：６６０－６６）をＢＭＰ６のアミノ酸配列に適用することにより、とくに抗原性を有するＢＭＰ６のエピトープを選択することができる。説明されている標準手順（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｓｕｐｒａ；Ｇｏｄｉｎｇ（１９８６）Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ（２ｄ ｅｄ）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；ならびに米国特許第４，３８１，２９２号；４，４５１，５７０号；および４，６１８，５７７号）により、$10^8 M^{-1}$、好適には$10^9 M^{-1}$～$10^{10} M^{-1}$またはそれより強い親和性を有するモノクロナール抗体を作成することができる。

【００３６】

抗体は、ＢＭＰ６の粗細胞抽出物またはほぼ精製したその断片に対して生成することができる。ＢＭＰ６断片を用いる場合、それらは好適にはＢＭＰ６タンパク質の連続したア

ミノ酸少なくとも１０個、より好適には少なくとも２０個を含む。ＢＭＰ６特異抗原および／または免疫原は、免疫反応を刺激する担体タンパク質に結合することができる。例えば、対象ポリペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）担体に共有結合され、共役体は免疫反応を向上させる完全フロインドアジュバント中で乳化される。実験用ウサギまたはマウスのような適切な免疫系は従来の手順に従って免疫される。

【００３７】

ＢＭＰ６特異抗体の存在は、対応する固定化ＢＭＰ６ポリペプチドを用いる固相酵素結合免疫吸着分析（ＥＬＩＳＡ）のような適切な分析によって評価される。放射免疫分析または蛍光分析のような他の分析を用いることもできる。

【００３８】

ＢＭＰ６ポリペプチド特異的キメラ抗体は、異なる動物種からの異なる部分を含有するように作成することができる。例えば、ヒト免疫グロブリン定常領域はマウスｍＡｂの各種領域と結合していてもよく、抗体はその生物学的活性をヒト抗体から、その結合特異性をマウス断片から誘導する。キメラ抗体は、それぞれの種からの適切な領域をコード化する遺伝子を組み換えることにより生成される（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（１９８４）８１：６８５１～６８５５；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８４）３１２：６０４－６０８；Ｔａｋｅｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８５）３１：４５２－４５４）。

【００３９】

キメラ抗体の一形態であるヒト化抗体は、組み換えＤＮＡ技術によりマウス抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）（Ｃａｒｌｏｓ，Ｔ．Ｍ．，Ｊ．Ｍ．Ｈａｒｌａｎ，１９９４，Ｂｌｏｏｄ ８４：２０６８－２１０１）をヒトフレームワーク領域および定常領域に移植することにより生成することができる。ヒト化抗体はマウス配列およびヒト配列を含有し、よって抗体特異性を保持しながら免疫原性をさらに低減または解消する（Ｃｏ ＭＳ，ａｎｄ Ｑｕｅｅｎ Ｃ．１９９１ Ｎａｔｕｒｅ ３５１：５０１－５０１；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ＳＬ．１９９２ Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎ．１０：２３９－２６５）。ヒト化抗体およびそれらの生成方法は当技術分野では周知である（米国特許第５，５３０，１０１号、５，５８５，０８９号、５，６９３，７６２号、および６，１８０，３７０号）。

【００４０】

アミノ酸架橋によってＦｖ領域の重鎖および軽鎖断片を結合することにより形成される組み換え型一本鎖ポリペプチドであるＢＭＰ６特異的一本鎖抗体は、当技術分野で知られる方法により生成することができる（米国特許第４，９４６，７７８号；Ｂｉｒｄ，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８）２４２：４２３－４２６；Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８８）８５：５８７９－５８８３；およびＷａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８９）３３４：５４４－５４６）。

【００４１】

他の好適な抗体生成技術は、リンパ球の抗原ポリペプチドへのｉｎ ｖｉｔｒｏ露出またはあるいはファージもしくは類似ベクターの抗体ライブラリーの選択を含む（Ｈｕｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８９）２４６：１２７５－１２８１）。

【００４２】

本発明のポリペプチドおよび抗体は、改良の有無にかかわらず用いることができる。しばしば、抗体は、検出可能なシグナルを提供する、または標的タンパク質を発現する細胞に対して毒性がある物質を共有または非共有結合することにより標識される（Ｍｅｎａｒｄ Ｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｍａｒｋｅｒｓ（１９８９）４：１３１－１３４）。さまざまな標識および共役技術が知られ、科学および特許文献の両方において広く報告されている。適切な標識としては、放射性核種、酵素、物質、共同因子、阻害因子、蛍光部分、蛍光発光ランタニド金属、化学発光部分、生物発光部分、磁性粒子、等が挙げられる（米国特許第３，８１７，８３７号；３，８５０，７５２号；３，９３９，３５０号；３，９９６，３４５号；４，２７７，４３７号；４，２７５，１４９号；およ

び４，３６６，２４１号）。また、組み換え型免疫グロブリンを生成することができる（米国特許第４，８１６，５６７号）。細胞質ポリペプチドに対する抗体を送達し、膜透過性タンパク質毒素との共役によりそれらの標的に到達させることができる（米国特許第６，０８６，９００号）。

【００４３】

別の実施形態では、その方法は、ＡＬＫ６に結合し、その活性を活性化または阻害することができる化合物を含む組成物の塗布を含む。例えば、こうした化合物は、ＡＬＫ６に結合することができる抗体またはその断片であってもよい。こうしたものとして、本発明は、ＡＬＫ６の作用薬または拮抗薬を含むことができる。例えば、抗体はＡＬＫ６を結合し、ＢＭＰ６の結合を防止し、よってＢＭＰ６がＡＬＫ６を活性化し、メラニン形成またはメラニン転移を促進するのを防止することができる。抗体生成の周知技術の詳細については上述している。

【００４４】

別の実施形態では、その方法は、ＡＬＫ６もしくはＣｄｃ４２またはその機能部分をコードするＤＮＡまたはＲＮＡとの相互作用によってＡＬＫ６またはＣｄｃ４２の発現を調節することができる核酸を含む組成物の塗布を含む。好適な実施形態では、核酸はＲＮＡ分子、とくにＡＬＫ６またはＣｄｃ４２をコード化するｍＲＮＡに対する標的アンチセンス相互作用またはＲＮＡ干渉をすることができるＲＮＡ分子である。例えば、Ｃｄｃ４２ｍＲＮＡを標的とする好適なＲＮＡｉ分子は、５’－ＧＡＵＡＡＣＵＣＡＣＣＡＣＵＧＵＣＣＡＴＴ－３’および５’－ＵＧＧＡＣＡＧＵＧＧＵＧＡＧＵＵＡＵＣＴＴ－３’オリゴリボヌクレオチドであり；または５’－ＧＡＣＵＣＣＵＵＵＣＵＵＧＣＵＵＧＵＵＴＴ－３’および５’－ＡＡＣＡＡＧＣＡＡＧＡＡＡＧＧＡＧＵＣＴＴ－３’オリゴリボヌクレオチド、もしくは他のこうした適切な特定の配列を用いてＣｄｃ４２を阻害することができる。ＡＬＫ６またはＣｄｃ４２に対するＲＮＡｉを示す他の適切な配列を決定することは、当業者の技術の範囲内である。

【００４５】

ＲＮＡｉは、配列が抑制遺伝子と相同である二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）により開始される、動物および植物における配列特異的転写後遺伝子抑制プロセスである。Ｃ．エレガンス、キイロショウジョウバエ、植物、およびヒトの抑制遺伝子に対してＲＮＡｉを用いることに関連する方法が知られている（Ｆｉｒｅ Ａ，ｅｔ ａｌ．，１９９８ Ｎａｔｕｒｅ ３９１：８０６－８１１；Ｆｉｒｅ，Ａ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．１５，３５８－３６３（１９９９）；Ｓｈａｒｐ，Ｐ．Ａ．ＲＮＡ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ ２００１．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１５，４８５－４９０（２００１）；Ｈａｍｍｏｎｄ，Ｓ．Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２，１１０－１１１９（２００１）；Ｔｕｓｃｈｌ，Ｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２，２３９－２４５（２００１）；Ｈａｍｉｌｔｏｎ，Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８６，９５０－９５２（１９９９）；Ｈａｍｍｏｎｄ，Ｓ．Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４０４，２９３－２９６（２０００）；Ｚａｍｏｒｅ，Ｐ．Ｄ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １０１，２５－３３（２０００）；Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ，Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４０９，３６３－３６６（２００１）；Ｅｌｂａｓｈｉｒ，Ｓ．Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１５，１８８－２００（２００１）；国際公開第０１／２９０５８号；同第９９／３２６１９号；Ｅｌｂａｓｈｉｒ ＳＭ，ｅｔ ａｌ．，２００１ Ｎａｔｕｒｅ ４１１：４９４－４９８；Ｎｏｖｉｎａ ＣＤ ａｎｄ Ｓｈａｒｐ Ｐ．２００４ Ｎａｔｕｒｅ ４３０：１６１－１６４；Ｓｏｕｔｓｃｈｅｋ Ｊ ｅｔ ａｌ ２００４ Ｎａｔｕｒｅ ４３２：１７３－１７８）。

【００４６】

核酸調節因子は、研究試薬、診断用薬、および治療薬としてよく用いられる。例えば、特定の遺伝子の機能を解明するのに、優れた特異度で遺伝子発現を阻害することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることが多い（例えば、米国特許第６，１６５，７９０号参照）。核酸調節因子は、例えば、生物学的経路の各種メンバーの機能を識別す

るのにも用いられる。例えば、アンチセンスオリゴマーは、動物および人間の病状の治療における治療部分として用いられ、多数の臨床試験において安全かつ有効であることが示されている（Ｍｉｌｌｉｇａｎ ＪＦ，ｅｔ ａｌ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｃｏｎｃｅｐｔｓ ｉｎ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ，Ｊ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ.（１９９３）３６：１９２３－１９３７；Ｔｏｎｋｉｎｓｏｎ ＪＬ ｅｔ ａｌ.，Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｖｅｓｔ.（１９９６）１４：５４－６５）。

【００４７】

１つの実施形態では、その方法は、後述するＡＬＫ６またはＣｄｃ４２に影響を及ぼす物質の同定方法により同定される組成物の塗布を含む。

【００４８】

本発明の好適な実施形態では、その物質はＡＬＫ６の拮抗薬である。本発明に用いるのに適切であり得るいくつかのＡＬＫ６拮抗薬としては、スクレロスチン、コーディン等およびホリスタチン関連タンパク質（ＦＳＲＰ）が挙げられる。とくに好適な実施形態では、拮抗薬はスクレロスチン（ＳＥＱ ＩＤ ３）である。

【００４９】

小分子は、酵素機能でタンパク質の機能を調節することがしばしば好ましく、および／またはタンパク質相互作用ドメインを含有する。当技術分野では「小分子」化合物と称される化学剤は、一般的には最大１０，０００、好適には最大５，０００ダルトン、より好適には最大１，０００、もっとも好適には最大５００ダルトンの分子量を有する有機非ペプチド分子である。このクラスの調節因子としては、化学的に合成した分子、例えば、組み合わせ化学ライブラリーからの化合物が挙げられる。合成化合物は、ＡＬＫ６タンパク質の既知または推定特性に基づいて合理的に設計または同定することができ、または化合物ライブラリーをスクリーニングすることにより同定することができる。このクラスの適切な代替調節因子は、天然物、とくに植物または菌類のような有機体からの二次代謝産物であり、化合物ライブラリーをＡＬＫ６調節活性スクリーニングすることにより同定することもできる。化合物の生成および調達方法は当技術分野では周知である（Ｓｃｈｒｅｉｂｅｒ，ＳＬ，Ｓｃｉｅｎｃｅ（２０００）１５１：１９６４－１９６９；Ｒａｄｍａｎｎ Ｊ ａｎｄ Ｇｕｎｔｈｅｒ Ｊ，Ｓｃｉｅｎｃｅ（２０００）１５１：１９４７－１９４８）。

【００５０】

後述するスクリーニング分析から同定される小分子調節因子を、候補臨床化合物を設計、最適化、および合成することができるリード化合物として用いることができる。候補小分子調節剤の活性は、さらに後述する反復二次機能の有効化、構造決定、ならびに候補調節因子の改良および試験によって数倍向上させることができる。また、候補臨床化合物は、とくに臨床的および薬理学的特性に関して生成される。例えば、医薬開発のため試薬はｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏ分析を用いて誘導体化および再スクリーニングし、活性を最適化し、毒性を最小化することができる。

【００５１】

ＡＬＫ６の拮抗薬は、メラニン細胞からケラチン細胞へのメラニンの転移を阻害し、これにより皮膚および／または毛髪の色素沈着を低減することができるものであってもよい。一方で、ＡＬＫ６の作用薬は、メラニン細胞からケラチン細胞へのメラニンの転移を促進し、これにより皮膚および毛髪の色素沈着を増加させることができるものであってもよい。美容の観点からするとこれらの作用の両方が望ましくあり得、さらにこうした作用からの医学的利点があり得る。例えば、現在西欧および米国（ならびにその他の地域）では、美容上の理由で日焼けした外観を有することが望ましい。アジアのいくつかの国では、美容上の理由で比較的色白な外観を有することが望ましい。さらに、メラニンが日光の損傷作用からの皮膚の保護に関わることを考えれば、保護の観点から皮膚のメラニン含量を増加させることが望ましくあり得る。

【００５２】
対象は哺乳類、好適には霊長類、とくにヒトであることが好ましい。
【００５３】
別の態様では、本発明は、対象の皮膚および／または毛髪の色素沈着の調節に用いるＡＬＫ６またはＣｄｃ４２の活性または発現を調節することができる物質を含む組成物を提供する。適切な物質の詳細については上述しており、調節は美容または治療目的であってもよい。
【００５４】
とくに好適な物質としては、ＢＭＰ６または機能的に活性なその変異体あるいは断片、およびスクレロスチンが挙げられる。
【００５５】
別の態様では、本発明は、皮膚の異常な色素沈着に関連する疾病の治療用の薬剤の製造におけるＡＬＫ６またはＣｄｃ４２の活性または発現を調節することができる物質を含む組成物の使用を提供する。こうした治療は治癒的であってもよく、症状を軽減するためのものであってもよい。
【００５６】
本発明による組成物は、皮膚への局所塗布に適していることが一般的に望ましい。溶液、懸濁液、ジェル、クリーム、または軟膏等のような、いずれかの一般的な局所製剤を用いることができる。こうした局所製剤の調製については、例えばＧｅｎｎａｒｏ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇが示すように、薬剤製剤技術分野において説明されている。局所塗布について、組成物は、粉末またはスプレーとして、とくにエアロゾル形態で投与することもできる。
【００５７】
さらなる態様によれば、本発明は、物質のメラニン細胞からケラチン細胞への、または潜在的にはケラチン細胞からケラチン細胞へのメラニンの転移を調節する能力の評価方法を提供するが、その方法は：
－試験物質を用意する工程；および
－試験物質のＡＬＫ６と相互作用する能力を決定する工程
を含む。
【００５８】
いくつかの実施形態では、その方法は、物質のＡＬＫ６に結合する能力を決定することを含む。ＡＬＫ６は細胞上にあってもよく、支持体上に備わっていてもよい。
【００５９】
好適には、その方法は、ＡＬＫ６を発現する細胞を用意し、試験物質の該細胞により発現したＡＬＫ６、とくに細胞の表面上に発現したＡＬＫ６と相互作用する能力を決定することを含む。
【００６０】
好適には、ＡＬＫ６を発現する細胞はメラニン細胞である。
【００６１】
試験物質のＡＬＫ６と相互作用する能力を決定することにより、メラニン転移またはメラニン形成の調節に有効である可能性を有する物質を同定することが可能である。
【００６２】
好適には、本発明の方法は、試験物質のＡＬＫ６の活性および／または発現を調節する能力を決定することを含む。
【００６３】
１つの実施形態では、その方法は、試験物質のＡＬＫ６を活性化する能力を決定すること、すなわち試験物質がＡＬＫ６の作用薬であるかを決定することを含むことができる。
【００６４】
代替実施形態では、その方法は、試験物質のＡＬＫ６を不活性化する能力を決定するこ

と、すなわち試験物質がＡＬＫ６の拮抗薬であるかを決定することを含むことができる。
【００６５】
試験物質がＡＬＫ６の活性を調節することができるかを当業者が決定することができる方法は多数ある。例えば、ＡＬＫ６活性化により生じる下流シグナル伝達分子に対する試験物質の作用を決定することが可能である。あるいは、ＡＬＫ６活性化により生じるｍＲＮＡまたはタンパク質の発現に対する試験物質の作用を決定することが可能である。これは、例えば、ａ）Ｒ－Ｓｍａｄ（受容体調節Ｓｍａｄ、Ｓｍａｄ－１、－５、－８）の動員およびその後ＡＬＫ６に結合する際のそのリン酸化反応；ｂ）抑制型Ｓｍａｄ（Ｉ－Ｓｍａｄ）、例えばＳｍａｄ６および７によるＲ－Ｓｍａｄの活性化の阻害；またはｃ）Ｓｍｕｒｆ（Ｓｍａｄユビキチン化調節因子）によるＡＬＫ６の選択的分解を決定することを含むことができる。
【００６６】
当業者が物質のＡＬＫ６の発現を増加させる能力を決定することができる方法も多数ある。例えば、当業者は細胞中のＡＬＫ６　ｍＲＮＡレベルを（例えば定量的ｒｔＰＣＲを用いて）定量的に測定することができ、または細胞の表面上のタンパク質発現を（例えば免疫蛍光測定技術、ＥＬＩＳＡ、二次元電気泳動または質量分光法を用いて）定量的に測定することができる。
【００６７】
１つの実施形態では、その方法は、試験物質のＣｄｃ４２の発現または活性化、好適にはＣｄｃ４２の発現への作用を決定することにより、試験物質のＡＬＫ６と相互作用する能力を決定する工程を含むことができる。Ｃｄｃ４２の発現の決定方法は、細胞中または細胞上のＣｄｃ４２タンパク質の量を測定すること、またはＣｄｃ４２タンパク質合成の前駆体、例えばＣｄｃ４２をコードするｍＲＮＡの量を測定することを含む。Ｃｄｃ４２タンパク質の発現レベルまたはＣｄｃ４２　ｍＲＮＡレベルを測定するのに必要な技術は、当業者には明らかである。タンパク質レベルを測定する技術は、免疫染色（例えば、免疫蛍光、ウエスタンブロッティング）、ＥＬＩＳＡ、二次元電気泳動または質量分光法を含むことができる。ｍＲＮＡレベルを測定する技術は、ノーザンブロッティング、逆転写ＰＣＲ、定量ＰＣＲ、マイクロアレイまたはＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ（登録商標）チップを含むことができる。
【００６８】
とくに、本発明は、メラニン形成またはメラニン転移に影響を及ぼすようにＡＬＫ６と相互作用することができる物質に関する。従って、試験物質のメラニン形成またはメラニン転移への作用を決定することがとくに望ましい。これを達成する方法、例えば物質のメラニン細胞からケラチン細胞へ、または潜在的にはケラチン細胞からケラチン細胞へ転移したメラノソーム数への作用を決定することについて、本出願において詳しく説明する。これは、本出願に記載する免疫染色技術を用いて達成することができる。
【００６９】
本発明の方法は、ＢＭＰ６を用意する工程を含むことができる。その方法においてＢＭＰ６を用意することにより、試験物質のＡＬＫ６の活性をその生物学的配位子存在下で調節する能力を決定することが可能である。こうした方法は、化合物のＢＭＰ６と競合してＡＬＫ６と相互作用する能力を評価するので、生理学的条件で用いるのにより有用であり得る。
【００７０】
さらなる態様では、本発明は、物質のメラニン細胞からケラチン細胞へ、または潜在的にはケラチン細胞からケラチン細胞へのメラニンの転移を調節する能力の評価方法を提供するが、その方法は：
－試験物質を用意する工程；
－Ｃｄｃ４２を発現する細胞を用意する工程；ならびに
－試験物質のＣｄｃ４２の活性および／または発現を調節する能力を決定する工程
を含む。

【００７１】
好適には、Ｃｄｃ４２を発現する細胞はメラニン細胞またはケラチン細胞、より好適にはメラニン細胞である。
【００７２】
その方法は、試験物質で処理した細胞におけるＣｄｃ４２の活性および／または発現を対照細胞におけるＣｄｃ４２の活性および／または発現と比較することを含むことができる。
【００７３】
Ｃｄｃ４２の発現レベルは、当業者には明らかである多くの方法により測定することができる。本発明の実施形態では、発現は、免疫蛍光、ウエスタンブロッティングを用いて、またはＣｄｃ４２　ｍＲＮＡのレベルを測定することにより決定することができる。上記のとおり、他の適切な方法は当業者には明らかである。
【００７４】
ここで本発明の実施形態について、ほんの一例として、添付の図面を参照しながら説明する。
【図面の簡単な説明】
【００７５】
【図１】表皮ケラチン細胞および表皮メラニン細胞のＢＭＰ６インキュベーションｉｎｖｉｔｒｏに対する細胞毒性の評価結果を示す。Ａ．正常なヒト表皮ケラチン細胞培養（女性－６８；ｐ２）を１０ｎｇ／ｍｌおよび１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６で２４時間、４８時間および７２時間処理した。Ｂ．正常なヒト表皮メラニン細胞培養（ｉ）女性－６８；ｐ４および（ｉｉ）女性－４２；ｐ３を１０ｎｇ／ｍｌおよび１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６で７２時間処理した。細胞毒性を細胞死および細胞病理学的形態変化により評価した。細胞毒性作用は見られない。
【図２】正常なヒト表皮メラニン細胞におけるＢＭＰ６およびＡＬＫ６タンパク質発現の検出結果を示す。Ａ．ヒト表皮メラニン細胞（Ｆ３９－ＭＣ）におけるＢＭＰ６タンパク質発現を確認する（ｉ）ＢＭＰ６（緑）；（ｉｉ）チロシナーゼ（赤）；ならびに（ｉｉｉ）ＢＭＰ６およびチロシナーゼの組み合わせ画像の二重免疫標識。（ｉｖ）は対応する明視野像を示す。Ｂ．（ｉ）ＢＭＰ６（緑）、（ｉｉ）ＡＬＫ６（赤）、ならびに（ｉｉｉ）ヒト表皮メラニン細胞（Ｆ３９－ＭＣ）におけるＢＭＰ６およびＡＬＫ６の共局在化を示すものの二重免疫標識。（ｉｖ）は対応する明視野像を示す。
【図３】表皮メラニン細胞－ケラチン細胞共培養における用量依存的ＢＭＰ６刺激性メラノソーム転移の定量分析の結果を示す。Ａ．ＢＭＰ６の上昇する濃度で刺激された適合するメラニン細胞－ケラチン細胞共培養（Ｆ３９　ＭＣ－ＫＣ）に２４時間二重免疫蛍光を行った（１、１０、５０、１００および５００ｎｇ／ｍｌ）。抗ｇｐ１００抗体（緑）および抗サイトケラチン抗体（赤）での二重免疫標識は、ケラチン細胞へ転移した蛍光スポットの数の著しい用量依存的増加を示した。細胞核はＤＡＰＩで染色した。Ｂ．異なる処理群それぞれについてランダムに選択した５つの顕微鏡視野（視野１つ当たり細胞合計２０個）における転移メラノソームの定量化。値は、非刺激対照レベルと比較したケラチン細胞１個当たりのｇｐ１００陽性スポットの数の割合増加として表した。平均は、＊＝Ｐ＜０．０５、＊＊＝Ｐ＜０．０１、および＊＊＊＝Ｐ＜０．００１での３つの独立した実験の±ＳＥＭである。
【図４】ＢＭＰ６が表皮メラニン細胞におけるＣｄｃ４２およびＡＬＫ６（ＢＭＰ６受容体）発現を上方調節するかを決定する実験および結果を示す。正常なヒト表皮メラニン細胞培養（女性３９ｙ－ＭＣ）におけるＣｄｃ４２　ｍＲＮＡ発現のＲＴ－ＰＣＲ分析。Ａ．１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６での指示時間の処理。Ｂ．指示用量での２時間のＢＭＰ６処理。Ｃｄｃ４２　ｍＲＮＡをＲＴ－ＰＣＲにより検出した。同程度装填の内部対照としてＧＡＰＤＨを用いた。Ｃ．正常なヒト表皮メラニン細胞培養（女性４２ｙ－ＥＭ）を１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６の有無にかかわらず１２時間処理した。ＡＬＫ６（緑）を免疫標識し、（ｉ）未処理対照と比較した（ｉｉ）ＢＭＰ６影響下でのＡＬＫ６発現の増加を

示す。対応する明視野像（下のパネル）。
【図５】Ｃｄｃ４２発現の誘導が背側の糸状仮足形成およびメラノソーム転移を増加させることを示す実験の結果を示す。Ａ．（ｉｉ）構成的に活性な（ＣＡ）ヒトＧＦＰ－Ｃｄｃ４２（６１Ｌ）でトランスフェクトしたＦＭ５５細胞の背側表面は背側糸状仮足数の大幅な増加をもたらし、（ｉｉｉ）優勢阻害（ＤＮ）ヒトＧＦＰ－Ｃｄｃ４２（１５Ａ）でトランスフェクトした細胞は（ｉ）ＧＦＰ単独存在下での糸状仮足と比較して背側糸状仮足を阻害した。囲み領域の高倍率図（下のパネル）。電界放射ＳＥＭ（ＦＥＩ、Ｑｕａｎｔａ　４００）を用いて１０ｋｅＶの加速電圧で生成したＳＥＭ画像。Ｂ．（左のパネル）トランスフェクトＦＭ５５細胞－ケラチン細胞共培養に二重免疫蛍光を行った。（ｉ）ＦＭ５５およびケラチン細胞における単独ＧＦＰ（ｉｉ）ＦＭ５５およびケラチン細胞における構成的に活性な（ＣＡ）ヒトＧＦＰ－Ｃｄｃ４２（６１Ｌ）ならびに（ｉｉｉ）ＦＭ５５およびケラチン細胞の共培養における優性阻害（ＤＮ）ヒトＧＦＰ－Ｃｄｃ４２（１５Ａ）。抗ｇｐ１００抗体（緑）および抗サイトケラチン抗体（赤）での二重免疫標識は、異なる構成物存在下でケラチン細胞へ転移した蛍光スポットの数の明らかな増加を示した。細胞核をＤＡＰＩで染色した。Ｂ．（右のパネル）異なる処理群それぞれについてランダムに選択した５つの顕微鏡視野（視野１つ当たり細胞合計２０個）における転移メラノソームの定量化。値は、非刺激対照レベルと比較したケラチン細胞１個当たりのｇｐ１００陽性スポットの数の割合増加として表した。平均は、＊＊＊Ｐ＜０．００１での３つの独立した実験の±ＳＥＭである。補足１：トランスフェクトＦＭ５５細胞の選択をＧＦＰ発現（緑）により確認した。メラニン細胞の同一性を確認するため、トランスフェクト細胞をメラニン細胞特異的抗ＨＭＢ－４５／ｇｐ１００（赤）で免疫標識した。細胞核をＤＡＰＩで染色した。
【図６】選択的ＢＭＰ６拮抗薬（スクレロスチン）を用いるＢＭＰ６誘導性メラノソーム転移の阻害を示す実験の結果を示す。Ａ．適合するメラニン細胞－ケラチン細胞共培養（女性３６ｙ　ＭＣ－ＫＣ）に組み換え型ヒトＢＭＰ６（１００ｎｇ／ｍｌ）存在または非存在下でその選択的拮抗薬、組み換え型ヒトスクレロスチン（４００ｎｇ／ｍｌ）の添加の有無にかかわらず２４時間二重免疫蛍光を行った。抗ｇｐ１００抗体（緑）および抗サイトケラチン抗体（赤）での二重免疫標識は、基準レベルと比較してＢＭＰ６存在下でケラチン細胞へ転移した蛍光スポットの数の明らかな増加を示し、それは選択的拮抗薬スクレロスチンを共培養に添加すると著しく減少した。細胞核をＤＡＰＩで染色した。Ｂ．異なる処理群それぞれについてランダムに選択した５つの顕微鏡視野（視野１つ当たり細胞合計２０個）における転移メラノソームの定量化。値は、非刺激対照レベルと比較したケラチン細胞１個当たりのｇｐ１００陽性スポットの数の割合増加として表した。平均は、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１での３つの独立した実験の±ＳＥＭである。
【図７】選択的ＢＭＰ６拮抗薬（スクレロスチン）を用いるＢＭＰ６誘導性Ｃｄｃ４２およびＡＬＫ６受容体発現の阻害を示す実験の結果を示す。Ａ．Ｃｄｃ４２　ｍＲＮＡ発現のＲＴ－ＰＣＲ分析：正常なヒト表皮メラニン細胞（女性４２ｙ－ＥＭ）を組み換え型ヒトＢＭＰ６（１００ｎｇ／ｍｌ）存在または非存在下でその選択的拮抗薬、組み換え型ヒトスクレロスチン（４００ｎｇ／ｍｌ）の添加の有無にかかわらず２時間培養した。Ｃｄｃ４２　ｍＲＮＡをＲＴ－ＰＣＲにより検出し、同程度の装填の内部対照としてＧＡＰＤＨを用いた。Ｂ．正常なヒト表皮メラニン細胞（女性４２ｙ－ＥＭ）を組み換え型ヒトＢＭＰ６（１００ｎｇ／ｍｌ）存在または非存在下、その選択的拮抗薬、組み換え型ヒトスクレロスチン（４００ｎｇ／ｍｌ）の添加の有無にかかわらず１２時間培養した。ＡＬＫ６（緑）を免疫標識し、スクレロスチンの影響下でのＢＭＰ６誘導性ＡＬＫ６発現の阻害を示す。対応する明視野像（下のパネル）。
【図８】選択的ＢＭＰ６拮抗薬（スクレロスチン）を用いるＢＭＰ６誘導性糸状仮足形成の阻害を示す実験の結果を示す。正常なヒト表皮メラニン細胞（女性４２ｙ－ＥＭ）を組み換え型ヒトＢＭＰ６（１００ｎｇ／ｍｌ）存在または非存在下でその選択的拮抗薬、組み換え型ヒトスクレロスチン（４００ｎｇ／ｍｌ）の添加の有無にかかわらず７２時間培養した。電界放射ＳＥＭ（ＦＥＩ、Ｑｕａｎｔａ　４００）を用いて１０ｋｅＶの加速電

圧で生成したＳＥＭ画像。
【図９】ＢＭＰ６の、ヒト表皮メラニン形成、チロシナーゼ活性ならびにｍＲＮＡおよびタンパク質レベルでのチロシナーゼの発現への作用を示す実験の結果を示す。Ａ．正常なヒト表皮メラニン細胞（Ｆ６２；ｐ４）を組み換え型ヒトＢＭＰ６（１００ｎｇ／ｍｌ）存在または非存在下でその選択的拮抗薬、組み換え型ヒトスクレロスチン（４００ｎｇ／ｍｌ）の添加の有無にかかわらず７２時間処理した。細胞は、異なる薬での処理後メラニンレベルの明らかな変化を示した。水酸化ナトリウムを溶かした後、メラニン含量を分光光度法（４７５ｎｍ）で測定した。結果を非刺激対照レベルと比較したメラニン含量（ｐｇ／細胞）の変化として表した。平均は、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１での３つの独立した実験の±ＳＥＭである。Ｂ．正常なヒト表皮メラニン細胞（女性６２ｙ；ｐ４）を組み換え型ヒトＢＭＰ６（１００ｎｇ／ｍｌ）存在または非存在下でその選択的拮抗薬、組み換え型ヒトスクレロスチン（４００ｎｇ／ｍｌ）の添加の有無にかかわらず７２時間処理した。下のパネル：チロシナーゼ活性の評価のため、抽出タンパク質を電気ブロットし、細胞膜をＬ－ＤＯＰＡで染色した。上のパネル：バンド強度および値の濃度測定走査を非刺激対照レベルと比較した増加倍数として表した。平均は＊＊Ｐ＜０．０１での３つの独立した実験の±ＳＥＭである。Ｃ．正常なヒト表皮メラニン細胞（女性６２ｙ；ｐ４）を組み換え型ヒトＢＭＰ６（１００ｎｇ／ｍｌ）存在または非存在下でその選択的拮抗薬、組み換え型ヒトスクレロスチン（４００ｎｇ／ｍｌ）の添加の有無にかかわらず７２時間処理した。上のパネル：チロシナーゼｍＲＮＡをＲＴ－ＰＣＲにより検出し、同程度の装填の内部対照としてＧＡＰＤＨを用いた。下のパネル：チロシナーゼタンパク質をウエスタンブロッティングにより検出し、同程度の装填の内部対照としてアクチンを用いた。
【発明を実施するための形態】
【００７６】
（序論）
メラニン転移の生物学についての研究中、本発明者らは、このプロセスにおける骨形成タンパク質（ＢＭＰ）ファミリーのメンバーの潜在的な役割を研究した。本出願では、ヒト皮膚メラニン細胞からヒト皮膚ケラチン細胞へのメラニン転移を調節する新規機序について記載する。これは、このプロセスを用量依存的に刺激することができるＢＭＰ６の作用を含む。また、選択的ＢＭＰ６拮抗薬（スクレロスチン）の添加は、ヒトメラニン細胞の走査電子顕微鏡（ＳＥＭ）分析により証明されるように、ＢＭＰ６誘導性メラノソーム転移を阻害し、（糸状仮足と呼ばれる）ナノ管のＢＭＰ６誘導性生成を阻害する。ＢＭＰ６が糸状仮足形成を誘導する分子機序を分析し、ＢＭＰ６がヒトメラニン細胞における（細胞分裂周期４２）Ｃｄｃ４２の発現を用量依存的に刺激することが、逆転写分析を用いて見出された。メラニン細胞の糸状仮足形成およびメラノソーム転移におけるＣｄｃ４２の動員は、トランスフェクトした構成的に活性な（ＣＡ）Ｃｄｃ４２および優性阻害（ＤＮ）Ｃｄｃ４２を有するＦＭ５５細胞のＳＥＭ分析を用いて確認された。ＣＡ－Ｃｄｃ４２は背側糸状仮足形成を誘導するが、ＤＮ－Ｃｄｃ４２は背側糸状仮足を阻害する。
【００７７】
ＢＭＰ６は、約１５Ｋｄの計算分子量を有する１３２アミノ酸の成熟ポリペプチドを生成するように切断される前駆体分子として合成されると予測される。ＢＭＰ６（前駆体）は、ヒトの染色体６ｐ２４に限局する、長さ５１３アミノ酸の、５７ｋＤのタンパク質である。ＢＭＰ６の成熟形態は、ポリペプチド鎖１つ当たり３つの潜在的なＮ結合型グリコシル化部位を含有する。活性ＢＭＰ６タンパク質分子はおそらく二量体である。成熟形態へのＢＭＰ６の処理は、関連タンパク質ＴＧＦβの処理と類似の方法による二量化およびＮ末端領域の除去を含む（Ｇｅｎｔｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．８：４１６２（１９８８））。ヒトＢＭＰ６前駆体は、ＧｅｎＢａｎｋデータベース（受入番号－Ｐ２２００４）に規定され、ＵｎｉｐｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１参照）に組み込まれている。成熟ポリペプチドはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸３７４～５１３を含むと考えられる。他の活性ＢＭＰ６ポリペプチドとし

ては、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸３８２～５１３、３８８～５１３、４１２～５１３を含むポリペプチドが挙げられる。

【００７８】

ＢＭＰは、ほとんどすべての正常な細胞の表面上に見られ、Ｉ型およびＩ型受容体からなる受容体複合体に結合することにより機能する。ＢＭＰＲ－Ｉは、単量体として存在する場合、ＢＭＰを低親和性に結合する。一方で、ＢＭＰＲ－ＩおよびＢＭＰＲ－ＩＩがヘテロ二量体として存在する場合、それらのＢＭＰ親和性は大幅に増加する（Ｈｏｇａｎ，１９９６）。分泌されると、ＢＭＰ二量体は、Ｉ型およびＩＩ型受容体の両方に協同的に結合することにより、シグナル伝達を開始する。ＢＭＰ６の各単量体は、Ｉ型およびＩＩ型受容体の両方に接続することができる。よって、四量体受容体複合体の組み立てはシグナルを細胞内に導入するのに不可欠である。

【００７９】

ＩＩ型受容体は、配位子結合の際にＩ型受容体をリン酸転移する構成的に活性なキナーゼである。一方で、Ｉ型受容体は、リン酸化反応により細胞内物質を活性化し、よって細胞内シグナルの特異性を決定する。ＢＭＰ６を含むＢＭＰは、ＢＭＰＲ－ＩＡ（ＡＬＫ３；Ｓｅｑ　ＩＤ　４）およびＢＭＰＲ－ＩＢ（ＡＬＫ６；Ｓｅｑ　ＩＤ　２）を含む２つのタイプのＩ型受容体に結合することができる。ＢＭＰＲ－ＩＡおよびＢＭＰＲ－ＩＢは構造的に類似しているが、異なる空間的および時間的発現パターンを示す。

【００８０】

ＢＭＰ６がその特異的な同族受容体、ＡＬＫ６（受入番号Ｏ００２３８）の発現を誘導することも見出された。選択的ＢＭＰ６拮抗薬スクレロスチンは、メラニン細胞におけるＣｄｃ４２発現とともに、このＢＭＰ６誘導性ＡＬＫ６発現を阻害し、Ｃｄｃ４２はＢＭＰ６シグナル伝達の考えられる増幅ループに関与することを示した。これらの発見はともに、メラニン細胞ＢＭＰ受容体から生じるＣｄｃ４２シグナルがケラチン細胞へのメラノソーム転移を調節する糸状仮足形成に関与することを示す。

【００８１】

スクレロスチン（ＳＯＳＴ）のアミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋデータベース（受入番号－Ｑ９ＢＱＢ４）に規定され、ＵｎｉｐｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３参照）に組み込まれている。ＳＯＳＴのＣ末端領域（ＳＥＱ　ＩＤ　３のアミノ酸１６９～２０３）はＳＯＳＴ二量化において役割を果たす。ＳＯＳＴのＮ末端領域（ＳＥＱ　ＩＤ　３のアミノ酸２３～５８）はＢＭＰ６上のＩ型およびＩＩ型受容体結合部位の両方と相互作用し、コア領域（ＳＥＱ　ＩＤ　３のアミノ酸１３４～１４６）の一部はＩＩ型受容体結合部位と相互作用することができ、これらのＳＯＳＴ領域に特異的な抗体はＢＭＰのＳＯＳＴへの結合を阻害または低下することができる。

【００８２】

最後に、ＢＭＰ６がメラニン細胞における律速酵素（チロシナーゼ）の発現および活性を刺激することによりメラニン形成を誘導することができることも示された。

【００８３】

本出願では、ＢＭＰ６がメラニン細胞とケラチン細胞との、潜在的にはケラチン細胞とケラチン細胞との間のメラニン転移を調節することができることを初めて示した。これは、少なくとも部分的には、Ｃｄｃ４２の作用によって起こる。ＢＭＰ拮抗薬、ならびにそれらの構造および作用に基づく分子を、哺乳類の皮膚および毛髪の色素沈着の新規調節因子として用いることができる。

【実施例】

【００８４】

（材料および方法）

細胞培養：適合する表皮ケラチン細胞および表皮メラニン細胞の分離および培養

インフォームドコンセントおよび地元の研究倫理委員会の承認とともに、選択的な美容整形手術後の、皮膚フォトタイプＩＩ（女性６８ｙ、３９ｙ、３６ｙ）および皮膚フォトタイプＶＩ（女性４２ｙ）を有する正常で健康な白人ドナーからヒト腹部皮膚を得た。

【００８５】
すべての細胞培養試薬は、とくに指定のない限り、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｌｔｄ．（スコットランド、ペーズリー）から得た。皮膚試料をＲＰＭＩ１６４０培地に回収し、手術後５時間以内に処理した。表皮メラニン細胞培養を前述のように構築し（Ｋａｕｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）、１％ＦＢＳ、１倍濃度非必須アミノ酸混合物、ペニシリン（１００Ｕ／ｍｌ）／ストレプトマイシン（１００μｇ／ｍｌ）、２mMのＬ－グルタミン、５ｎｇ／ｍｌの塩基性線維芽細胞成長因子（ｂＦＧＦ）、および５ｎｇ／ｍｌのエンドセリン－１（Ｓｉｇｍａ、英国ドーセット州プール）を添加したＫ－ＳＦＭおよびＥａｇｌｅの最小必須培地（ＥＭＥＭ）の混合物中で増殖させた。完全に適合する表皮ケラチン細胞（すなわち同じ皮膚試料からのもの）を前述のように構築し（Ｋａｕｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）、２５μｇ／ｍｌのウシ下垂体抽出物（ＢＰＥ）、０．２ｎｇ／ｍｌのｒＥＧＦ、ペニシリン（１００Ｕ／ｍｌ）／ストレプトマイシン（１００μｇ／ｍｌ）、および２mMのＬ－グルタミンを添加したケラチン細胞無血清培地（Ｋ－ＳＦＭ）で増殖させた。培地を１日おきに補充した。ケラチン細胞およびメラニン細胞の初代培養を、それぞれ抗サイトケラチン抗体（Ａｂｃａｍ、英国ケンブリッジ）およびメラニン細胞特異的ＮＫＩ／ｂｅｔｅｂ抗体（Ｍｏｎｏｓａｎ、オランダ、ウデン）からｇｐ１００までを用いて同定した。

【００８６】
共培養研究のため、メラニン細胞（継代４）およびケラチン細胞（継代２）を８ウェルＬａｂ－Ｔｅｋ（登録商標）チャンバースライド（ＩＣＮ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．、米国オハイオ州オーロラ）上に$1\times10^{4}$細胞／ウェルの細胞密度およびケラチン細胞１０個に対してメラニン細胞１個の比で播種した。共培養をＫ－ＳＦＭおよびＭＥＭの混合物（共培地）に一晩（１６時間）保持して細胞接着させた後、培地を補充してさらに２４時間置いた。

【００８７】
共培養を血清飢餓培地（すなわち、ウシ胎児血清およびウシ下垂体抽出物が不足しているもの）で１６時間インキュベートし、成長因子の外因性供給源を除去した後、１００ｎｇ／ｍｌの組み換え型ヒトＢＭＰ６（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍ、英国オックスフォードシャー州）および４００ｎｇ／ｍｌの組み換え型ヒトスクレロスチン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍ、英国オックスフォードシャー州）の作用を２４時間評価した。

【００８８】
（ＢＭＰ６用量の評価）
表皮メラニン細胞（ＭＣ）および表皮ケラチン細胞（ＫＣ）を、血清を添加した完全ＭＥＭメラニン細胞およびＫ－ＳＦＭケラチン細胞培地で６ウェルプレート上に播種し、２４時間置いた。細胞を１０ｎｇ／ｍｌおよび１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６を添加した無血清培地（いわゆる飢餓培地）に移し、２４時間、４８時間、および７２時間置いた。細胞毒性を細胞死および細胞病理学的形態変化により評価した。

【００８９】
約$1\times10^{4}$個のＭＣをＬａｂ－ｔｅｋ（登録商標）８ウェルチャンバースライドの各ウェル中に播種し、２４時間置いて接着させた。次に細胞を無菌ＰＢＳで３回洗浄し、３５０μｌの飢餓、無血清メラニン細胞培地を添加し、３７℃および５％$CO_2$で２４時間インキュベートした。次に細胞を無菌ＰＢＳで３回洗浄し、１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６の有無にかかわらず１２時間インキュベートした。次に細胞を無菌ＰＢＳで３回軽く洗浄し、氷冷メタノールにおいて－２０℃で１０分間定着させた。免疫細胞化学的分析を行うまでスライドを－２０℃で保存した。

【００９０】
（ウエスタンブロット分析）
融合性Ｔ２２５フラスコ中のＭＣをトリプシン処理し、完全培地を有するＴ２５フラスコ中に播種し、一晩接着させた。処理の２４時間前に培地を飢餓培地に取り替え、２４時間置いた。細胞を無菌ＰＢＳで３回洗浄し、飢餓培地のみまたは１００ｎｇ／ｍｌのＢＭ

Ｐ６を添加して異なる時間（１～２４時間）インキュベートした。異なる実験では、細胞を異なる濃度のＢＭＰ６で１２時間処理した。

【００９１】

各細胞抽出物からの総タンパク質４０ｍｇを還元ＳＤＳ－８％－ＰＡＧＥ中で電気泳動させ、ＰＶＤＦ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、マサチューセッツ州ベッドフォード）上にブロットした。膜を５％乳ＰＢＳ／０．０７５％Ｔｗｅｅｎ２０を用いて室温で２時間ブロックした後、一次抗体を用いて４℃で一晩プローブした。分子量ラダー（Ｍａｇｉｋ　Ｍａｒｋｅｒ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を５％乳ＰＢＳ／０．０７５％Ｔｗｅｅｎ２０中でインキュベートし、膜ストリップをロッキングプラットフォーム上で１ｍｌの５％乳ＰＢＳ／０．０７５％Ｔｗｅｅｎ２０（陰性対照）、または１ｍｌのウサギ抗チロシナーゼ（２００：１の５％乳ＰＢＳ／０．０７５％Ｔｗｅｅｎ２０中ポリクロナール抗体）および１ｍｌのヤギ抗アクチン（１０００：１の５％乳ＰＢＳ／０．０７５％Ｔｗｅｅｎ２０中ポリクロナール抗体）を用いて４℃で一晩インキュベートした。大規模な洗浄後、ブロットをセイヨウワサビペルオキシダーゼ共役二次抗体で２時間インキュベートした。次に分子量ラダーを５％乳ＰＢＳ／０．０７５％Ｔｗｅｅｎ２０中に希釈した１ｍｌのＨＲＰ－ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｚｙｍｅｄ、米国）（５００：１）でインキュベートし、膜ストリップをロッキングプラットフォーム上で１ｍｌの抗ウサギＩｇＧセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗体（ＨＲＰ）二次抗体（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、英国）（１：７００で５％乳ＰＢＳ／０．０７５％Ｔｗｅｅｎ２０中に希釈）において室温で２時間インキュベートした。洗浄手順を繰り返し、膜ストリップをＬｕｍｉＧＬＯ（登録商標）試薬および過酸化物（ＢｉｏＬａｂ　Ｌｔｄ、英国）において室温で２分間インキュベートした。ブロットストリップをＫｏｄａｋ　ＸＲＡ　Ｘ線フィルム（Ｋｏｄａｋ、英国）にさまざまな露出時間で露出した後、バンドが現れるまで現像液（Ｋｏｄａｋ、英国）中で現像し、水道水ですすぎ、フィルムが青くなるまで定着液（Ｋｏｄａｋ、英国）中で定着させた後、水道水ですすぎ、乾燥させることにより、化学発光シグナルを検出した。次に、解析ソフトウェア（Ｉｍａｇｅ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｔｏｔａｌ　Ｌａｂ　バージョン１．１１）を用いるタンパク質発現レベルの半定量評価のための濃度測定分析のため、膜を標識し、走査した。

【００９２】

（免疫蛍光染色）

氷冷メタノール中で定着させた細胞をＰＢＳ中で洗浄した後、タンパク質発現の検出のため１０％ロバ血清でブロックした。二重標識実験のため、第１の一次抗体として、ＢＭＰ６（Ａｂｃａｍ、英国ケンブリッジ）、ＢＭＰＲ－ＩＢ／ＡＬＫ６（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、英国オックスフォードシャー州）またはＮＫｉ／Ｂｅｔｅｂ（１：３０）（Ｍｏｎｏｓａｎ、オランダ、ウデン）を塗布して４℃で一晩置いた後、ＦＩＴＣ共役二次抗体（１：１００）を用いて室温で１時間インキュベートした。第２の一次抗体として、サイトケラチン（１：１００）（Ａｂｃａｍ、英国ケンブリッジ）またはβ－アクチン（１：１００）（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、米国）を塗布して室温で１時間置いた後、ＴＲＩＴＣ共役二次抗体（１：１００）（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．、米国ウエストグローブ）を塗布した。ＤＡＰＩ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｒａｔｏｒｉｅｓ、カリフォルニア州バーリンゲーム）を用いて細胞核を染色した。冷却型浜松デジタルカメラで対物１００倍または４０倍を用いて画像をキャプチャし、Ｐａｉｎｔ　Ｓｈｏｐ　Ｐｒｏ（Ｊａｓｃ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｖｅｒ．７、米国カリフォルニア州）を用いて後処理した。陰性対照は、一次抗体を省略し、二次抗体ホストからの非免疫血清で置き換え、二次抗体を含んだ。

【００９３】

（メラノソーム転移の定量分析）

適合するメラニン細胞－ケラチン細胞共培養を異なる用量のＢＭＰ６で刺激し、非刺激細胞と比較した。３つの独立した実験において１００倍の倍率（油浸）で１ウェル当たり５つのランダムな顕微鏡視野の受容ケラチン細胞内の蛍光ｇｐ１００陽性スポットを数え

ることにより、メラノソーム転移の評価を行った。メラニン細胞にも関連し得るメラニン顆粒を数えることを回避するため、我々はメラニン細胞と直接接触しないケラチン細胞内のｇｐ１００陽性スポットのみを数えた。

【００９４】

（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ））

１、５０、１００および５００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６で４時間または１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６で指定時間処理した$1\times10^6$個のメラニン細胞から総ＲＮＡを得た（図４Ａ）。いくつかの実験のため、メラニン細胞を４００ｎｇ／ｍｌのスクレロスチンの有無にかかわらず１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６の存在または非存在下でも処理した。ＲＮＡ試料をデオキシリボヌクレアーゼ（ＱＩＡＧＥＮ、英国）で処理した後、濃度を測定した。次に逆転写用Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩファーストストランド合成キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カリフォルニア州）を用いて第１ストランドｃＤＮＡを合成した。その反応におけるＲＮＡの最終濃度は、すべての試料について１μｇ／１００μｌだった。ＱＩＡＧＥＮ　Ｆａｓｔ　Ｃｙｃｌｉｎｇ　ＰＣＲキット（ＱＩＡＧＥＮ、英国）を用いて製造業者より説明される条件下でＰＣＲを行った。簡潔には、以下のサイクル条件を用いる：９５℃で１５分間（段階１）；９６℃で１５秒間；プライマーアニーリング１５秒間（Ｃｄｃ４２は４２～６５℃、チロシナーゼは５８℃、およびＧＡＰＤＨは６０℃）；７２℃で２５秒間（段階２）×３０サイクル。ＲＴ－ＰＣＲ反応に用いるプライマーは表１に示すが、Ｓｉｇｍａ－Ｇｅｎｏｓｙｓ、英国から入手した。ＰＣＲ生成物を１倍ＴＡＥ緩衝液中の１％アガロースゲルで分離し、臭化エチジウムで染色した。１ＫｂのＤＮＡ　Ｐｌｕｓ　ＤＮＡラダー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カリフォルニア州）をＤＮＡマーカーとして用いる。

【００９５】

【表１】

半定量RT-PCR用プライマー

| | 遺伝子 | 前進プライマー | 逆転プライマー | 生成物長さ (bp) |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Cdc42 | GCCCGTGACCTGAAGGCTGTCA | TGCTTTTAGTATGATGCCGACACCA | 195 |
| 2. | チロシナーゼ | CACCCCACAAATCCTAAC | CCTACTCTATTGCCTAAGCC | 1600 |
| 3. | GAPDH | GAAGGTGAAGGTCGGAGTACA | TTGTTTTGGAGGGATCTCG | 160 |

【００９６】

（トランスフェクション）

優性阻害ヒトＧＦＰ－Ｃｄｃ４２（１５Ａ）、構成的に活性なＧＦＰ－Ｃｄｃ４２（６１Ｌ）およびｐＥＧＦＰ－Ｃ３のＧＦＰは、Ｒｉｃｈａｒｄ　Ｅ．Ｃｈｅｎｅｙ（ノースカロライナ大学、チャペルヒル）の気前の良い寄贈品だった。ベクターはジェネティシン（Ｇ４１８）への耐性を与えるネオマイシン遺伝子を含んでいた。約$5\times10^5$個の中程度に色素沈着したＦＭ５５細胞を、トランスフェクションの前日１０％ＦＢＳを添加したＲＰＭＩ培地において１６時間６ウェルプレートで７０～８０％の密集度まで増殖させた。ＦＭ５５細胞をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００トランスフェクション試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、米国カリフォルニア州カールスバッド）を用いてトランスフェクトした。簡潔には、１．６ｍｌのＯｐｔｉ－ＭＥＭ低血清培地中で３．２μｇのｃＤＮＡ構成物を８μｌのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００トランスフェクション試薬と混合した。細胞をトランスフェクション混合物で１２時間インキュベートし、１倍ＰＢＳで３

回洗浄し、１０％ＦＢＳを含有する未使用ＲＰＭＩ中で４８時間インキュベートした。トランスフェクト細胞を１．６ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を用いて１５日間かけて選択した。次に$1\times10^4$個の安定なトランスフェクト細胞を８ウェルＬａｂ－Ｔｅｋ（登録商標）チャンバースライドにおいて１０％ＦＢＳを添加したＲＰＭＩ培地存在下で２４時間培養した。２４時間後、ＦＭ５５細胞の（糸状仮足を含む）形状の立体構造を保存するため、安定にトランスフェクトした細胞を０．１Ｍのカコジル酸ナトリウム（Ａｇａｒ、英国）中に緩衝させた１％グルタルアルデヒド（Ｓｉｇｍａ、英国）において３７℃ですぐに定着させ、ＳＥＭ分析のために処理した。８ウェルＬａｂ－Ｔｅｋ（登録商標）チャンバースライド上の平行な細胞も、氷冷メタノールにおいて－２０℃で１０分間定着させ、ＰＢＳ中で洗浄した後、ｇｐ１００免疫蛍光研究のため１０％ロバ血清でブロックし、トランスフェクションおよび選択を確認した（補足１）。共培養研究のため、安定にトランスフェクトしたＦＭ５５細胞およびケラチン細胞（継代２）を８ウェルＬａｂ－Ｔｅｋ（登録商標）チャンバースライド上に$1\times10^4$細胞／ウェルの細胞密度および１０個のケラチン細胞に対して１個のＦＭ５５という比で播種した。共培養をＫ－ＳＦＭおよびＭＥＭ（共培地）の混合物中に一晩（１６時間）保持し、細胞を接着させた後、培地を補充してさらに２４時間置いた。次に、メラノソーム転移効率を試験するｇｐ１００およびサイトケラチンの二重免疫蛍光研究のため、細胞を氷冷メタノールにおいて－２０℃で１０分間定着させ、ＰＢＳ中で洗浄した後、１０％ロバ血清でブロックした。

【００９７】

（細胞形態の走査電子顕微鏡評価）

４００ｎｇ／ｍｌのスクレロスチンの有無にかかわらず１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６の存在または非存在下で７２時間処理した表皮メラニン細胞および安定に選択トランスフェクトされたＦ５５細胞を０．１Ｍのカコジル酸ナトリウム（Ａｇａｒ、英国）中に緩衝させた１％グルタルアルデヒド（Ｓｉｇｍａ、英国）において３７℃で定着させた。次に細胞を媒染剤として用いられる１％四酸化オスミウム（Ａｇａｒ、英国）および１％タンニン酸（Ａｇａｒ、英国）中で後定着させ、一連の２０～７０％のアルコールによって脱水し、０．５％酢酸ウラニル中で染色した後、９０および１００％のアルコール中でさらに脱水した。ヘキサメチルージシラザン（Ｓｉｇｍａ、英国）中で最終脱水した後、空気乾燥させた。乾燥後、試料を金スパッター（ＥＭＩＴＥＣＨ、Ｋ５５０）（Ｂｌａｚｅｒ２０ｍＡ）において金で１０分間コーティングした。試料を電界放射型ＳＥＭ（ＦＥＩ、Ｑｕａｎｔａ４００）下、１０ｋｅＶの加速電圧で観察した。

【００９８】

（メラニン分析）

５００μｇ／ｍｌの合成メラニン（Ｓｉｇｍａ、英国）を１Ｍの水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）（ＢＯＨ　Ｌｔｄ、英国）中で調製し、超音波水槽中で２０分間溶解させた。この原液から、各種メラニン標準液を１００μｇ／ｍｌ～１μｇ／ｍｌの１ＭのＮａＯＨ中で調製した。メラニン標準液をピペットで９６ウェルプレートに取り、試験試料中のメラニン含量の評価について較正曲線を作成した。４００μｌの１ＭのＮａＯＨを各細胞ペレットに添加し、ヒートブロック（１００℃）上で１５分間溶解させた。ペレットを激しく渦撹拌し、可溶化したペレットをピペットで同じ９６ウェルプレートに取った。試料の光学密度をＤＹＮＥＸ　ＲＥＶＥＬＡＴＩＯＮ　４．０２プログラム上４９５ｎｍで読んだ。各試験試料のメラニン含量を較正曲線から読んだ。

【００９９】

（チロシナーゼ活性の評価のための非変性ＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いるＤＯＰＡオキシダーゼ検出）

約$1\times10^6$個の表皮メラニン細胞を３つのＴ７５フラスコ中に播種し、３７℃および５％$CO_2$で一晩インキュベートした。細胞をＳＤＳ－ＰＡＧＥ用に用意し、ＰＶＤＦ膜上にトランスブロットした。７０μｇの非還元タンパク質抽出物を沸騰せずにピペットで適切なウェルの８％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルに取った。別々のタンパク質を含有するＰＶＤＦ膜を１倍ＰＢＳ中で１回洗浄した後、０．１Ｍのリン酸ナトリウム緩衝液中の５ｍＭの

Ｌ－ＤＯＰＡにおいてＬ－ＤＯＰＡを３回交換しながら室温で３時間インキュベートした。膜を蒸留水で洗浄することによりＬ－ＤＯＰＡ反応を停止し、膜を走査した。

【０１００】

（統計分析）

群と処理との統計的有意性を、Ｐｒｉｓｍ　ｖ．４．００（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、米国イリノイ州シカゴ）を用いる一元配置ＡＮＯＶＡおよびダネット事後検定を用いて評価した。統計的に有意な差はアスタリスクで示す：＊＊＝Ｐ＜０．０１、＊＊＊＝Ｐ＜０．００１。

【０１０１】

（考察の結果）

ＢＭＰ６（１０および１００μｇ／ｍｌ）は正常なヒト表皮メラニン細胞およびケラチン細胞に対する細胞毒性を示さない

ＢＭＰ６がメラニン細胞またはケラチン細胞に対して毒性がある可能性を排除するため、細胞を１０ｎｇ／ｍｌおよび１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６存在下で２４時間、４８時間および７２時間保持した。ＢＭＰ６の２つの用量は、メラニン細胞およびケラチン細胞の細胞増殖または形態の変化とは関係ない（図１Ａ、１Ｂ）。

【０１０２】

正常なヒト表皮メラニン細胞はＢＭＰ６タンパク質および受容体ＡＬＫ６を発現する

正常なヒトメラニン細胞におけるＢＭＰ６の発現を、抗ＢＭＰ６（緑、Ａｉ）と抗チロシナーゼ抗体（赤、Ａｉｉ）の二重免疫標識（黄橙、Ａｉｉｉ）により確認した。抗ＢＭＰ６（緑、Ｂｉ）および抗ＡＬＫ６（赤、Ｂｉｉ）抗体でのメラニン細胞の二重免疫標識は、細胞全体でＢＭＰ６およびＡＬＫ６の共局在化（黄、Ｂｉｉｉ）を示した。

【０１０３】

用量依存的ＢＭＰ６刺激性メラノソーム転移の定量分析

メラニン細胞－ケラチン細胞共培養へのＢＭＰ６処理がメラニン細胞からケラチン細胞へのメラノソーム転移の刺激を用量依存的にもたらすように（図３Ａ、Ｂ）、ＡＬＫ６受容体は有効である。よって、これはメラニン細胞－ケラチン細胞共培養系におけるメラノソーム転移に対するＢＭＰ６の作用についての初めての報告である。オートクリンおよびパラクリン作用の両方が含まれ得る。

【０１０４】

ＢＭＰ６はヒト表皮メラニン細胞におけるＣｄｃ４２メッセージ発現を上方調節する

メラノソーム転移におけるＢＭＰ６の機序的役割をより良く理解するため、我々はヒトメラニン細胞におけるＣｄｃ４２の発現；糸状仮足形成の主要調節因子を研究した（Ｓｃｏｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００２）。ＲＴ－ＰＣＲ分析は、未処理対照におけるＣｄｃ４２　ｍＲＮＡの基礎レベルの発現と比較して、Ｃｄｃ４２の最大誘導が１００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ６での処理後２～４時間で起こった後、わずかに減少するが、最長１２時間高いままであることを示した（図４Ａ）。ＢＭＰ６によるＣｄｃ４２　ｍＲＮＡの誘導は用量依存的に起こった（図４Ｂ）。ＢＭＰ６は、正常なヒト表皮メラニン細胞におけるＡＬＫ６（図４Ｃｉ）の発現の正常な基礎レベルと比較して、ＢＭＰ６受容体ＡＬＫ６（緑、図４Ｃｉｉ）の発現も刺激した（図４Ｃ）。

【０１０５】

背側糸状仮足を誘導することによりメラノソーム転移を刺激するＣｄｃ４２の要件

２種類のＲｈｏタンパク質変異体：ＧＴＰアーゼ活性化タンパク質（ＧＡＰ）が阻害されるため、構成的にＧＴＰ結合である活性化変異体；およびグアニンヌクレオチド交換因子（ＧＥＦ）を滴定することにより作用する優性阻害変異体を広く用い、それらの機能を分析してきた（Ｆｅｉｇ、１９９９）。我々は、対照ベクターと比較すると、構成的に活性なＣｄｃ４２が背側糸状仮足を誘導し、優性阻害Ｃｄｃ４２がＦ５５ヒトメラノーマの背側糸状仮足を阻害することを見出した（図５Ａ）。

【０１０６】

我々は次に、Ｃｄｃ４２タンパク質の過剰発現もメラノソーム転移に影響を及ぼし得る

かを究明することに強い意欲を示した。メラニン転移へのこれらの過剰発現タンパク質の関与を試験するため、トランスフェクトＦＭ５５細胞を用いてＦＭ５５メラノーマ－ケラチン細胞共培養を２４時間かけて構築した。この共培養の抗ｇｐ１００抗体（緑）での免疫標識は、ケラチン細胞（白い矢印）へ転移した蛍光スポットの数の明らかな変化を示した（図５Ｂ、左のパネル）。ＧＦＰ対照ベクターと比較して、構成的に活性なＧＦＰ－Ｃｄｃ４２はメラノソーム転移を誘導するが、優性阻害ＧＦＰ－Ｃｄｃ４２はメラノソーム転移を阻害した（図５Ｂ、右のパネル）。Ｃｄｃ４２の過剰発現または阻害によるメラノソーム転移の操作はさらに、メラノソーム転移への糸状仮足の強い関与を示す。ＢＭＰ６はＣｄｃ４２の発現を上方調節することができるので、これはＢＭＰ６に関連するメラノソーム転移の刺激にその下流標的としてＣｄｃ４２が関与し得ることを示す。これを試験するため、我々はＤＮ－Ｃｄｃ４２の糸状仮足形成およびメラノソーム転移に対する阻害作用を利用した。これも同様に、ヒトＣｄｃ４２に対してｓｉＲＮＡを用いてヒトメラニン細胞の内因性Ｃｄｃ４２発現を崩壊させることにより、達成することができる。

【０１０７】

選択的ＢＭＰ６拮抗薬（スクレロスチン）を用いるＢＭＰ６誘導性メラノソーム転移の阻害

スクレロスチン（選択的ＢＭＰ６拮抗薬）がＢＭＰ６誘導性メラノソーム転移を阻害するかどうかを試験するため、我々はこの拮抗薬を正常なヒト表皮メラニン細胞－ケラチン細胞共培養において試験した。スクレロスチンの添加そのものは、基礎レベルのメラニン細胞からケラチン細胞へのメラノソーム転移を阻害した（図６Ａ、Ｂ）。また、スクレロスチンはヒト表皮メラニン細胞－ケラチン細胞共培養におけるＢＭＰ６誘導性メラノソーム転移を阻害し、スクレロスチンを哺乳類の皮膚および毛髪色素沈着の新規調節因子として用いることができることを示した（図６Ａ、Ｂ）。

【０１０８】

選択的ＢＭＰ６拮抗薬（スクレロスチン）を用いるＢＭＰ６誘導性Ｃｄｃ４２およびＡＬＫ６受容体発現の阻害

我々は、メラニン細胞からケラチン細胞へのメラノソーム転移の調節因子としてのＣｄｃ４２の生理学的役割について初めて示した（図５Ｂ）。スクレロスチンのＢＭＰ６誘導性メラノソーム転移を阻害する能力は、スクレロスチンがヒトメラニン細胞におけるＣｄｃ４２のＢＭＰ６誘導性発現を阻害し得ることを示した。ヒトメラニン細胞のＲＴ－ＰＣＲ分析を用い、我々は実際にスクレロスチンがＣｄｃ４２のＢＭＰ６誘導性発現を下方調節することを見出した（図７Ａ）。免疫蛍光研究を用い、我々はスクレロスチンがＢＭＰ６受容体であるＡＬＫ６（緑）のＢＭＰ６誘導性発現を下方調節することも見出した（図７Ｂ）。この発見は、Ｃｄｃ４２がＢＭＰ６シグナル伝達の考えられる増幅ループに関与することを示す。

【０１０９】

選択的ＢＭＰ６拮抗薬（スクレロスチン）を用いるＢＭＰ６誘導性糸状仮足形成の阻害

メラニン細胞のＳＥＭ分析は、未処理対照と比較して、多数のＢＭＰ６処理による背側糸状仮足の刺激を示す（図８ｉｉｉ）。スクレロスチンで処理したメラニン細胞は背側糸状仮足形成の低減を示し、一方ＢＭＰ６で処理した細胞はスクレロスチン存在下で糸状仮足形成を誘導しなかった（図８ｉｉ、ｉｖ）。これらのデータは、ヒトメラニン細胞における背側糸状仮足形成の刺激についてのＢＭＰ６の要件を強く裏付ける。

【０１１０】

ＢＭＰ６誘導性メラノソーム転移の阻害（図６）とともに、スクレロスチンによるＣｄｃ４２およびＡＬＫ６受容体発現の阻害（図７）および糸状仮足形成の阻害（図８）は、メラニン細胞ＢＭＰ受容体から生じるＣｄｃ４２シグナルがケラチン細胞へのメラノソーム転移を調節する糸状仮足形成に関与することを示す。

【０１１１】

ヒト表皮メラニン細胞におけるメラニン形成へのＢＭＰ６の作用

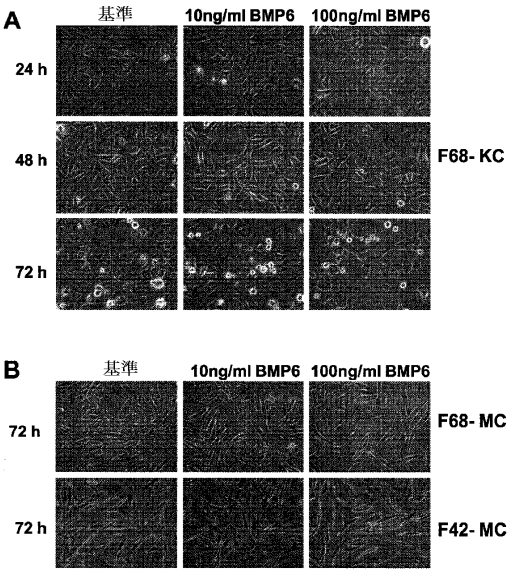
ＢＭＰ６はヒト表皮メラニン細胞ｉｎ　ｖｉｔｒｏ中のメラニン含量を（７２時間後約

３２±９％）増加させた（図９Ａ）。選択的ＢＭＰ６拮抗薬スクレロスチンは、ヒト表皮メラニン細胞中のＢＭＰ６誘導性メラニン含量を（１５±３％）抑制した（図９Ａ）。チロシナーゼ活性（メラニン合成の可能性の指標）もＢＭＰ６により刺激されたが、スクレロスチンはチロシナーゼ活性のＢＭＰ６誘導性増加を抑制した（図９Ｂ）。

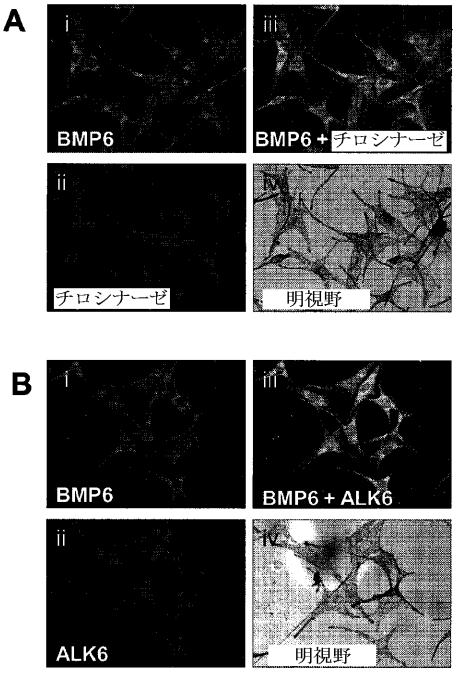
【０１１２】

要約：メラニン細胞におけるメラニン形成の誘導のためのシグナル伝達機序の研究は、タンパク質キナーゼＡによって作用するｃＡＭＰ上昇剤が、チロシナーゼの発現を増加させることによりメラニン細胞におけるメラニン形成を誘導することを示した（Ｂｅｒｔｏｌｏｔｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）。この簡略スキームを越えて、ＭＳＨ、紫外線またはヒト胎盤のスフィンゴ脂質での処理により、ｐ３８　ＭＡＰＫカスケードがメラニン細胞におけるメラニン形成に関与することも示された（Ｇａｌｉｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００１；Ｓｍａｌｌｅｙ　ａｎｄ　Ｅｉｓｅｎ，２０００；Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）。近年、ＢＭＰもメラニン形成の強力な調節因子として浮上してきている（Ｂｏｔｃｈｋａｒｅｖ，２００３；Ｙａａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）。ＢＭＰ４はメラニン細胞における律速酵素（チロシナーゼ）の発現および活性を阻害することにより、正常なヒトメラニン細胞におけるメラニン形成のオートクリン阻害因子として作用することが見出された（Ｙａａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）。我々の研究では、我々はＢＭＰ６がタンパク質および遺伝子レベルの両方でチロシナーゼの発現を刺激することにより、メラニン形成の刺激因子として作用することを見出した（図９Ｃ）。一方で、スクレロスチンは、タンパク質および遺伝子レベルの両方でヒト表皮メラニン細胞におけるＢＭＰ６誘導性チロシナーゼ発現を阻害した（図９Ｃ）。

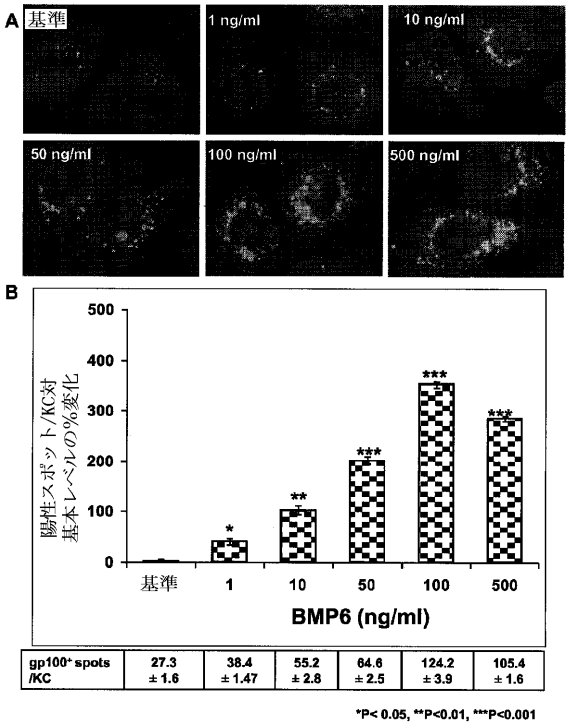
【図１】




【図２】



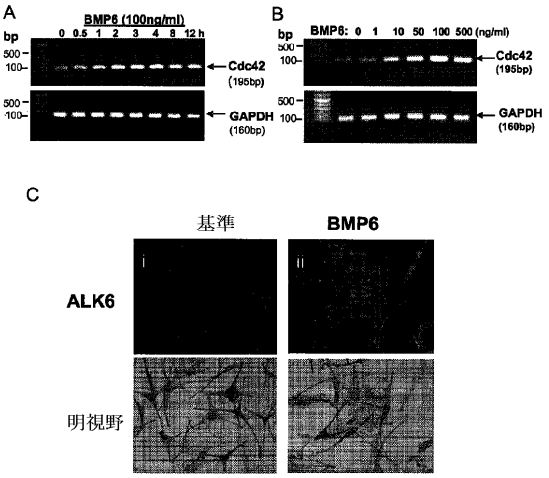
【図３】



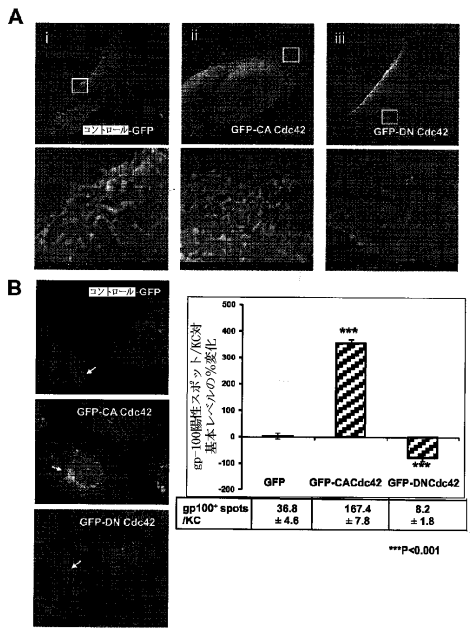

| gp100+ spots /KC | 27.3 ± 1.6 | 38.4 ± 1.47 | 55.2 ± 2.8 | 64.6 ± 2.5 | 124.2 ± 3.9 | 105.4 ± 1.6 |
|---|---|---|---|---|---|---|

*P< 0.05, **P<0.01, ***P<0.001

【図４】




【図５】



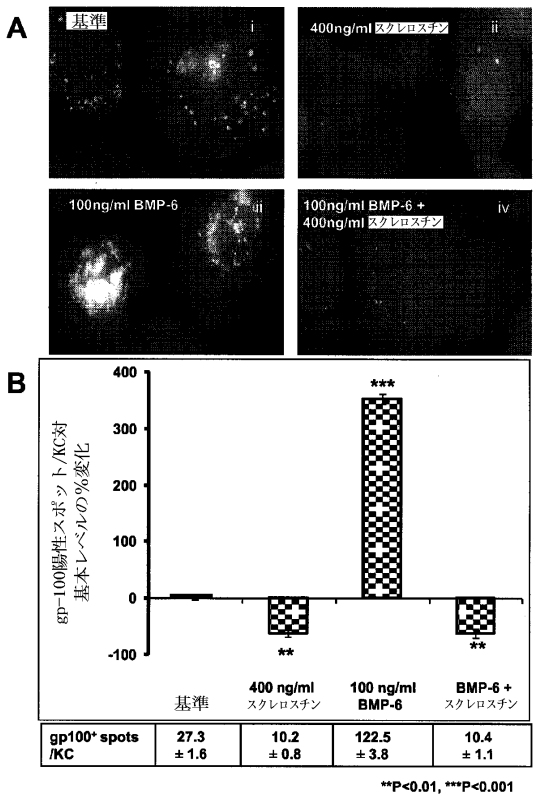

| gp100+ spots /KC | 36.8 ± 4.6 | 167.4 ± 7.8 | 8.2 ± 1.8 |
|---|---|---|---|

***P<0.001

補足-1



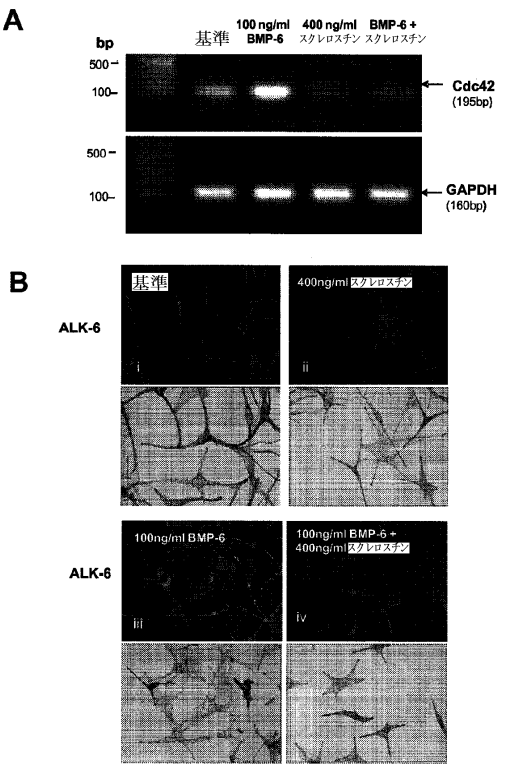

【図６】



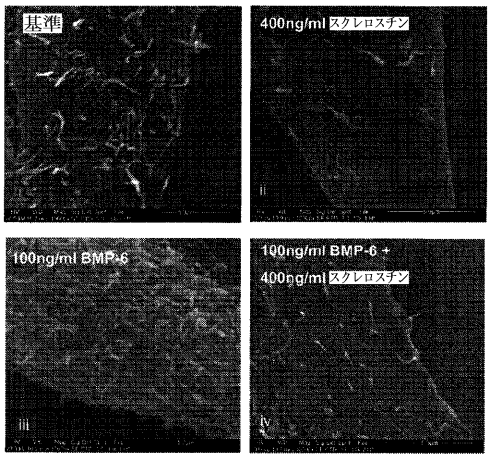

| gp100+ spots /KC | 27.3 ± 1.6 | 10.2 ± 0.8 | 122.5 ± 3.8 | 10.4 ± 1.1 |
|---|---|---|---|---|

**P<0.01, ***P<0.001

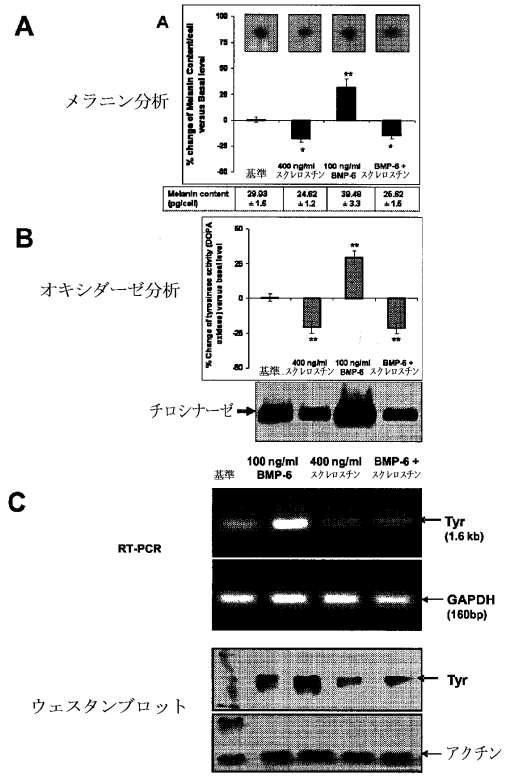
【図７】


A
bp
基準
100 ng/ml BMP-6
400 ng/ml スクレロスチン
BMP-6 + スクレロスチン
500
100
Cdc42 (195bp)
GAPDH (160bp)
B
ALK-6
基準
400ng/ml スクレロスチン
100ng/ml BMP-6
100ng/ml BMP-6 + 400ng/ml スクレロスチン
i
ii
iii
iv

【図８】


基準
400ng/ml スクレロスチン
100ng/ml BMP-6
100ng/ml BMP-6 + 400ng/ml スクレロスチン
i
ii
iii
iv

【図９】


A
メラニン分析
% change of Melanin Contentical versus Basal level
基準
400 ng/ml スクレロスチン
100 ng/ml BMP-6
BMP-6 + スクレロスチン
Melanin content (pg/cell)
29.93 ± 1.6
24.62 ± 1.2
39.49 ± 3.3
26.82 ± 1.6
B
オキシダーゼ分析
% Change of tyrosinase activity (DOPA oxidase) versus basal level
チロシナーゼ
C
RT-PCR
Tyr (1.6 kb)
GAPDH (160bp)
ウェスタンブロット
Tyr
アクチン

【配列表】
0005773872000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | FI | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ***A61P 17/00*** | ***(2006.01)*** | | Ａ６１Ｐ | 17/00 | |
| ***A61Q 19/00*** | ***(2006.01)*** | | Ａ６１Ｑ | 19/00 | |
| ***A61Q 5/10*** | ***(2006.01)*** | | Ａ６１Ｑ | 5/10 | |
| *C12N 15/09* | *(2006.01)* | | Ｃ１２Ｎ | 15/00 | Ａ |

(72)発明者 スーマン クマール シン
イギリス国 ヨークシャー ビーディー８ ９イーエックス ブラッドフォード レジェンシー コート ５６
(72)発明者 デズモンド ジョン トビン
イギリス国 ヨークシャー ビーディー１８ ２イーエイチ ビングリー ライシュワース アベニュー １

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第２００８／０８２５２５（WO，Ａ１）
特表２００６－５０８０２６（ＪＰ，Ａ）
Biochemica et Biophysica Acta，２００６年，Vol.1760，p.487-494
Journal of Cell Science，２００２年，Vol.115，No.7，p.1441-1451
Experimental of Dermatology，２００８年 3月，Vol.17，p.418-426

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ １／００－１／７０
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
Ｃ１２Ｎ １／００－１５／９０
ＣＡ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ